



# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : Chimie Macromoléculaire et Supramoléculaire

---

Présentée et soutenue par *Fethi BENSAID*

Le 20 Septembre 2012

**Titre :** *Nouvelles Nanoparticules à base de Conjugués Polymériques Biodégradables pour des applications en Drug Delivery*

---

### JURY

*Jean Coudane, Professeur à l'Université de Montpellier 1 (Rapporteur)*

*Didier Gigmes, Directeur de Recherche CNRS à Marseille (Rapporteur)*

*Véronique Gilard, Professeur à l'Université de Toulouse III (Présidente)*

*Julien Nicolas, Chargé de Recherche CNRS à Châtenay-Malabry*

*Didier Bourissou, Directeur de Recherche CNRS à Toulouse*

*Harivardhan-Reddy Lakkireddy, Responsable de Recherche Sanofi R&D à Vitry-sur-seine*

---

**Ecole doctorale :** *Ecole doctorale Science de la matière*

**Unité de recherche :** *Laboratoire Hétérochimie Fondamentale et Appliquée (LHFA)*

**Directeur(s) de Thèse :** *Didier Bourissou*

**Rapporteurs :** *Jean Coudane et Didier Gigmes*



*Pour Kamilya, Yasmine*

*« Lorsqu'un jour le peuple veut vivre,  
Force est pour le Destin, de répondre »  
Abou El Kacem Chebbi*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Jean Coudane et Didier Giges d'avoir rapporté ce travail et d'avoir enrichi la discussion de leurs points de vue lors de la soutenance. Je remercie également la professeure Véronique Gilard d'avoir présidé ce jury et Monsieur Julien Nicolas d'avoir partagé son regard de spécialiste.

J'adresse également mes remerciements à M. Michel Veillard, qui a initié cette collaboration entre Sanofi et le LHFA. Je remercie très sincèrement Messieurs Didier Bazile et Harivardhan-Reddy Lakkireddy, qui ont suivi ce projet avec passion et intérêt tout au long de la thèse.

Et surtout je remercie très sincèrement Didier et Abder de m'avoir beaucoup aidé pour réussir au mieux mon projet de thèse. Je vous suis très reconnaissant de tout ce que vous m'avez appris : rigueur, méthodologie, motivation... Je vous remercie également pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées pendant cette thèse. J'ai eu énormément de chance de pouvoir travailler avec vous. Abder, merci pour la formule magique « les autres sont là et nous, on veut être lààààà !!! ».

Un grand merci également pour Ghenwa et Blanca d'avoir toujours répondu présentes aux différentes questions, et d'avoir participé activement à la super ambiance de l'équipe.

Je voudrais également remercier toutes les personnes que j'ai croisées au laboratoire pendant ces trois ans. Je commence tout d'abord par Aurélie qui m'a accueillie et m'a fait découvrir la boîte-à-gants et la ROP. Sans oublier Raluca pour sa gentillesse et son joli accent et Pascal pour ses gâteaux. Un grand Merci à Marie pour tous les moments qu'on a passé ensemble, avec ses folies et ses larmes faciles !!! C'était génial le mariage à la Grec !! Je pense également à la petite Susana et son petit accent.

Olivier TDB, merci beaucoup pour tout. Tu étais toujours là pour répondre à mes questions dans la bonne humeur, toujours disponible pour me donner un coup de pouce précieux dans certains moments de galère !! Merci beaucoup tous tes conseils et pour ta gentillesse. Je te souhaite sincèrement beaucoup de réussite dans la suite. On t'attend bien sûr à Lyon.

Damien, je te remercie beaucoup pour ton accueil, en particulier à Castelsarrasin. On a passé ensemble deux très bonnes années, surtout en dehors du labo avec les soirées foot et bières... J'avoue que ton sang froid m'a impressionné au labo, surtout avec toutes ses filles et

leurs caprices (on les aime bien malgré tout !!!). Heureusement, on s'est retrouvé Lyon. On a commencé avec une victoire de l'OL contre Valenciennes à Gerland et l'aventure continue. Pauline, arrivée quelques mois avant moi, merci pour le très bon magret de canard et le bon foie gras. Merci pour les folles soirées déguisées. Je te souhaite beaucoup de réussite et de bonheur en Allemagne, en attendant la suite.

J'arrive maintenant à ma petite espagnole Fanny. Je ne pourrais pas assez te remercier pour la bonne ambiance dans le bureau, dans le labo, sur la cursive et surtout dans les soirées Barça-Real (on gagne toujours !!!). Noël n'aime pas trop qu'on parle de ça, mais c'est la vérité (Allez Barça !!!). Fanny, tu étais toujours là pour moi, ta joie de vie m'a beaucoup aidé à passer de bons moments au labo, même aux moments les plus difficiles. Merci beaucoup pour les Tortillas, pour le Cidre, c'était génial nos pique-niques aux bords de la Garonne !!! Noël, respect pour ton calme devant le cyclone Fanny. Désolé pour tous les matchs perdus avec ta pseudo-équipe « le Real ». Mes amis, on se verra très bientôt et dès qu'on a l'occasion. On vous attend à Lyon.

Aline, l'aveyronnaise, arrivée deux ans après moi, s'est installée à côté de moi (au labo et dans le bureau). T'as su bien t'adapter rapidement dans l'équipe. C'est sûr que tes questions, des fois « incompréhensibles », ainsi que nos chamailleries vont beaucoup me manquer !!! Cette année il faut que tu trouves de la relève pour la potasse !!! Ah au fait, tu commences à avoir beaucoup de concurrence cette année, non !??? Allez, bon courage pour la dernière ligne droite. Jérôme, je te remercie beaucoup pour ta bonne humeur, pour les soirées made LHFA, pour la Feria !!! Je te souhaite beaucoup de réussite aussi pour la suite. Je remercie également les « nouveaux » sympathiques du labo, Marc et Max. Vous allez devoir supporter les caprices d'Aline. Vous allez assurer. Marc n'oublie pas de rater tes prochains trains et vols !!! Max, tu feras attention aux vitres des hôtes, tape pas trop fort !!!

Je n'oublierai jamais également tous les autres thésards et post-docs du LHFA : Nicolas T., D. et L., Dimitri, Manue, Dumitru, Sophie, Florie, Aymeric et Aurélie (on se voit de nouveau à Lyon), Roland, Yohan, Martha, Juliette, Ricardo, Fawzi (No stress, tout va bien se passer), Jordi, Hélène, Issam (félicitations pour le mariage), Lisa, Romain, Norio, Xabi, Yannick, Etienne (bon courage pour la fin), Thibaud (notre betinner, merci pour tous les jeux que t'as organisé pour nous. Grâce à toi, je commence à faire une fortune, un gain de 30 euros en trois ans, pas mal !!!). J'ai passé avec vous des très bons moments : soirées, ski, randonnée... En fin de compte, c'est pas mal du tout la vie d'un thésard.

Un grand merci à tout le personnel technique et administratif du LHFA. Olivier V., toujours là pour satisfaire nos caprices et apporter de la bonne humeur, toujours des aventures à raconter !!! Olivier, merci pour les pots, les repas des régions, les concours de pétanques... Sans toi on n'aurait pas une aussi bonne ambiance au LHFA. Christian, je tiens à te remercier sincèrement de m'avoir beaucoup aidé, en particulier pour les expériences de microscopie. Merci également pour les concours de pétanques et pour les bouteilles de Ricard qui vont avec !!! Un grand merci à Maryse pour son professionnalisme et sa disponibilité pour résoudre tous nos problèmes administratifs. Un grand merci à Isabelle, à Chantal Z. pour l'HPLC, Yannick et Christian (LCC), Pierre et Marc pour la RMN, Valérie pour les MALDI.

Merci et bonne continuation à tous ceux que j'ai pu oublier !!!

Je voudrais également remercier mes amis et ma famille pour tout leur soutien, même avant le début de la thèse. Je ne serais jamais arrivée jusqu'ici sans le soutien de ma famille. Je remercie mes parents qui n'ont jamais cessé de croire en moi et de m'encourager. Un grand merci à mes deux frères, Issam et Ali, pour leur soutien inconditionnel.

Et puis, je remercie ma chérie Kahena. Merci de m'avoir supporté durant ces trois années de thèse (même avant et sûrement après !!), avec toi on a pu surmonter plusieurs obstacles. Merci pour ton soutien et pour ton encouragement incessants depuis notre première rencontre. Merci pour le magnifique mariage réalisé pendant la thèse, ce n'était pas facile avec deux thèses en cours. Un grand merci pour notre petite magnifique Kamilya-yasmine. Une nouvelle vie commence pour notre petite famille...





## Abréviations

10-DAB	10-deacétylbaccatine
Ac	Acétyle
Ac <sub>2</sub> O	Anhydride acétique
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACUPA	S,S-2-[3-[5-amino-1-carboxypentyl]-ureido]-pentanedioic acid
ADEPT	Antibody-directed enzyme prodrug therapy
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMS	Acide méthane sulfonique
APTS	Acide <i>p</i> -toluène sulfonique
ARN	Acide ribonucléique
AUC	Area Under the Curve
BEMD	(3S)-3-benzoxycarbonyl ethylmorpholine-2,5-dione
Bis-MPA	Acide bis-méthoxy propionique
BnO-MPA	2,2'-méthoxy propionate de benzyle
CARS	Coherent Anti-Stokes Raman Scattering
CMC	Concentration Micellaire Critique
DBU	Diazabicyclo[5,4,0]-7-undecène
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DFT	Density Functional Theory
DIPC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimide
DLS	Dynamic light Scattering
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DOSY	Diffusion Ordered Spectroscopy
DP	Degré de polymérisation
DPTS	<i>p</i> -Toluènesulfonate de 4-(diméthylamino)pyridinium
EDCI	1-Ethyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDX	Energy Dispersive X-ray
EELS	Electron Energy Loss Spectroscopy
ESI	Spectrométrie de masse par ionisation électrospray
Et	Ethyle
Et <sub>2</sub> O	Ether diéthylique
EPR	Enhanced Permeation and Retention
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster
HOTf	acide trifluorométhanesulfonique
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IMes	1,3-bis-(2,4,6-triméthylphényl)-imidazol-2-ylidène
IP	Indice de polydispersité (Dispersité)
<i>i</i> Pr	Isopropyle
KDR	Kinase insert Domain Receptor
MALS	Multiangle light scattering
MBC	5-méthyl-5-benzoyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one
MCC	5-méthyl-5-carboxyl-1,3-dioxan-2-one
Me <sub>2</sub> NCyHex	Diméthylcyclohexylamine
MeOH	Méthanol
MeOTf	Trifluorométhanesulfonate de méthyle
Me <sub>6</sub> TREN	Tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine

M <sub>n</sub>	Masse molaire moyenne en nombre
M <sub>w</sub>	Masse molaire moyenne en poids
mPEG	Méthoxy-Poly(éthylène glycol)
MPS	Système Phagocytaire Mononucléaire
MS	Spectroscopie de Masse
MTBD	<i>N</i> -méthyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NHC	Carbène N-hétérocyclique
NP	Nanoparticule
ODN	Oligonucléotide
PA	Principe Actif
PACA	Poly(cyanoacrylate d'alkyle)
PBD	Polybutadiène
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCL	Polycaprolactone
PCS	Spectroscopie par corrélation de photons
Pd/C	Palladium sur charbon
PDEPT	Polymer-directed enzyme prodrug therapy
PDI	Indice de polydispersité
PEG	Poly(éthylène glycol)
PEE	Poly(éthyl éthylène)
PEO	Poly(éthylène d'oxyde)
Ph	Phényle
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle)
PLA	Poly(acide lactique)
PLLA	Poly( <i>L</i> -acide lactique)
PDLA	Poly( <i>D</i> -acide lactique)
PLGA	Poly(acide lactique- <i>co</i> -acide glycolide)
PLGG	Poly{(acide lactique)- <i>co</i> -[(acide glycolique)- <i>alt</i> -( <i>L</i> -acide glutamique)]}
PPO	Poly(propylène d'oxyde)
PS	Polystyrène
Ptxl	Paclitaxel
P2VP	Poly(2-vinyl pyridine)
Pyr	Pyridine
QLS	Diffusion quasi-élastique de la lumière
<i>rac</i>	Racémique
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
ROP	Ring Opening Polymerization
SANS	Small-Angle Neutron Scattering
SEC	Size Exclusion Chromatography
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy
Ta	Température ambiante
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butylammonium
TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène
TBDMS	<i>Tertio</i> -butyldiméthylsilane
TEA	<i>Tri</i> -éthylamine
TEM ou MET	Microscopie Electronique à Transmission
TES	<i>Tri</i> -éthylsilane
TBDPS	<i>Tertio</i> -butyldiphénylsilane
TFA	Acide trifluoroacétique

TIPS	<i>Tri</i> -isopropylsilane
THF	Tétrahydrofurane
TPGS	$\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate
UV	Ultra-Violet
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPF	Vascular Permeability Factor
WFI	Water For Injection



# Sommaire

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA VECTORISATION .....</b>	<b>7</b>
I. INTRODUCTION .....	9
1. Importance des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs .....	9
2. Principales barrières à la vectorisation par voie intraveineuse .....	11
a. Influence de la taille des nanoparticules sur leur biodistribution .....	11
b. Influence de la chimie de surface .....	14
3. Accumulation tumorale des nanoparticules grâce à l'effet EPR .....	14
4. Nanoparticules polymériques.....	16
a. Les micelles .....	17
b. Les nanosphères .....	19
c. Les nanocapsules et les polymersomes .....	21
II. UTILISATION DU PLA POUR LA PREPARATION DE NANOPARTICULES MATRICIELLES.....	23
1. Le PLA, un polymère biodégradable.....	23
2. Nanoparticules à base de PLA.....	26
a. Vecteurs de 1 <sup>ère</sup> génération - ciblage passif du système phagocytaire mononucléaire .....	26
b. Vecteurs de 2 <sup>ème</sup> génération - ciblage passif de la tumeur .....	28
c. Vecteurs de 3 <sup>ème</sup> génération - ciblage actif.....	33
III. NANOPARTICULES A BASE DE PEG-PLA POUR L'ADMINISTRATION DE TAXANES .....	37
1. Introduction sur les Taxanes.....	37
2. Encapsulation physique et libération de Taxanes.....	39
3. Encapsulation covalente et libération de Taxanes.....	42
a. Etat de l'art sur les espaceurs .....	43
b. Encapsulation covalente PEG-PLA/Taxanes .....	56
4. Etudes in vivo des Nanoparticules de PLA .....	61
IV. CONCLUSION .....	66
REFERENCES.....	69
<b>CHAPITRE II : PREPARATION DES CONJUGUES MPEG-PLA/TAXANE .....</b>	<b>77</b>
I. INTRODUCTION .....	79
1. Identification de la structure cible .....	79
2. Deux stratégies de synthèse .....	80
II. SYNTHÈSE DE MPEG FONCTIONNALISÉ .....	82
1. Voie carbonate .....	82
2. Voie de Synthèse du mPEG-OSiR <sub>3</sub> -Y-OH .....	83
III. SYNTHÈSE DES COPOLYMERES MPEG-PLA.....	90
1. Etat de l'art sur la ROP du lactide .....	90

a.	De la catalyse métallique à la catalyse organique .....	91
b.	Catalyseurs Nucléophiles/Basiques.....	93
c.	Catalyse cationique .....	95
d.	Organocatalyse Bifonctionnelle .....	96
2.	<i>Synthèse des copolymères mPEG-PLA avec le système thiourée/spartéine</i> .....	100
3.	<i>Déprotection du copolymère en Y</i> .....	107
4.	<i>Stratégie carbonate : ROP et hydrolyse de la liaison carbamate</i> .....	110
IV.	CONJUGAISON AVEC UN ANTICANCEREUX .....	111
1.	<i>Introduction</i> .....	111
2.	<i>Couplage du Cabazitaxel avec les copolymères mPEG-PLA via différents espaceurs</i> .....	111
V.	CONCLUSION .....	124
	REFERENCES.....	125
	PARTIE EXPERIMENTALE .....	129
<b>CHAPITRE III : PREPARATION ET EVALUATION DES NANOPARTICULES...</b>		<b>155</b>
I.	INTRODUCTION .....	157
II.	FORMULATION DES NANOPARTICULES .....	159
1.	<i>Etudes préliminaires</i> .....	159
a.	Solubilité.....	159
b.	Concentration micellaire critique (CMC).....	160
2.	<i>Nanoprécipitation des conjugués</i> .....	164
3.	<i>Détermination de la taille des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)</i> .....	166
4.	<i>Caractérisation des nanoparticules par microscopie électronique à transmission (MET)</i> .....	170
5.	<i>Potentiel Zêta</i> .....	171
6.	<i>Stabilité des Nanoparticules</i> .....	175
III.	LOCALISATION ET LIBERATION IN VITRO DU CABAZITAXEL.....	176
1.	<i>Localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules</i> .....	176
a.	Analyse microscopique .....	176
b.	RMN <sup>1</sup> H des nanoparticules dans le D <sub>2</sub> O.....	180
2.	<i>Libération in vitro du cabazitaxel</i> .....	185
a.	Libération in vitro dans les tampons de PBS et d'acétate .....	186
b.	Libération in vitro dans le plasma .....	189
IV.	ETUDES IN VIVO .....	192
V.	CONCLUSION .....	194
	REFERENCES.....	197
	PARTIE EXPERIMENTALE .....	199
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>		<b>211</b>

## ***Introduction Générale***





Des progrès spectaculaires ont été observés au cours de ces dernières décades pour le traitement de plusieurs pathologies. Néanmoins, certains traitements, notamment dans le cas des maladies cancéreuses, présentent une efficacité thérapeutique encore limitée et accompagnée d'effets secondaires considérables. Ces effets secondaires résultent d'une part de l'accumulation indésirable du principe actif dans des tissus sains qui provoque une certaine toxicité, d'autre part de la nature des excipients de la formulation galénique, telle que le Cremophor pour le Taxol®. L'adressage ciblé de molécules thérapeutiques vers un site d'action spécifique (un tissu ou une cellule malade) constitue actuellement un défi majeur pour le traitement de maladies cancéreuses et infectieuses. Ce concept s'apparente à celui du « *magic bullet* » imaginé il y a une centaine d'années par le savant Paul Ehrlich, dont l'objectif était d'acheminer un médicament vers son site d'action de manière spécifique.<sup>[1]</sup> Ce concept s'approche de plus en plus de la réalité avec le développement des nanotechnologies qui offrent des opportunités intéressantes pour la vectorisation ciblée de principes actifs ou d'agents de contrastes. Plusieurs types de nanoparticules ont été développés pour protéger ces agents de la dégradation et pour les acheminer vers leur site d'action. Cette vectorisation permet ainsi d'augmenter l'efficacité thérapeutique du principe actif et de réduire les effets secondaires.

Les objectifs de ces travaux de thèse consistent à développer et évaluer de nouvelles nanoparticules biodégradables et biocompatibles destinées à l'administration intraveineuse de taxanes. Dans un premier temps, ces nanoparticules ont pour vocation de transporter des agents thérapeutiques de la famille des taxanes destinés au traitement des maladies cancéreuses.

Dans le **Chapitre I**, nous présenterons dans une revue bibliographique les différentes nanoparticules développées ainsi que leur intérêt pour la vectorisation de principes actifs. Nous nous intéresserons ensuite au développement de nanoparticules polymériques à base de poly(acide lactique) (PLA), qui est biodégradable et bioassimilable, capables de franchir les barrières biologiques et d'acheminer le principe actif vers son site d'action. Enfin, nous discuterons l'utilisation de ces nanovecteurs biodégradables pour l'encapsulation (physique ou covalente) et la vectorisation des taxanes ainsi que leurs propriétés *in vitro* et *in vivo*. L'encapsulation covalente du principe actif semble avoir plusieurs avantages par rapport à

---

<sup>1</sup> K. Strebhardt, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, 8, 473-480.

l'encapsulation physique. Elle permet ainsi de maîtriser et d'améliorer l'efficacité d'encapsulation et le taux de charge et permet également d'obtenir une libération contrôlée et prolongée du principe actif, évitant ainsi l'effet « burst » observé avec l'encapsulation physique. Dans la littérature, le principe actif est généralement couplé à l'extrémité de chaîne de PLA. Après préparation des nanoparticules, le principe actif se retrouve piégé dans le cœur hydrophobe. Il en résulte donc une libération très lente, ce qui pourrait limiter son efficacité thérapeutique *in vivo*. Cette libération est en effet contrôlée par l'accessibilité du principe actif à l'hydrolyse (enzymatique et/ou chimique), par la dégradation du polymère et par la diffusion du principe actif. Notre stratégie consiste à préparer de nouveaux conjugués capables d'encapsuler le principe actif de manière covalente tout en essayant d'avoir une libération contrôlée et rapide.

Dans le **Chapitre II**, nous présenterons la synthèse de deux structures de conjugués polymériques à base de PEG-PLA/Taxane (structure linéaire conventionnelle et structure Y). La structure Y comporte le principe actif à la jonction PEG/PLA, pour permettre de préparer des nanoparticules contenant les principes actifs à l'interface hydrophobe/hydrophile, ce qui rendrait le PA plus accessible à l'hydrolyse et accélérerait ainsi la cinétique de libération. Deux principaux paramètres ont été modulés pour la préparation de différents conjugués : la longueur de chaîne du PLA et la nature de l'espaceur entre le copolymère et le principe actif. Dans ce chapitre, nous détaillerons également les différentes techniques analytiques qui ont permis d'atteindre des degrés de caractérisations élevés, contrairement aux conjugués décrits dans la littérature.

Par ailleurs, le positionnement du PA ne doit perturber ni la formation des nanoparticules, ni leur stabilité. Pour mesurer l'effet de la structure macromoléculaire sur tous ces aspects, nous avons mené une étude comparative entre le conjugué linéaire « conventionnel » et le nouveau conjugué de structure Y. Ces conjugués sont ensuite formulés en nanoparticules. Ces formulations seront décrites dans le **Chapitre III**. Tout d'abord, nous présenterons les propriétés d'auto-assemblage des différents conjugués (linéaires et Y). Ensuite, nous détaillerons les méthodes de préparation des nanovecteurs et l'influence de la nature de la structure sur leurs propriétés physico-chimiques (taille, charge de surface, stabilité...). Puis, nous étudierons l'influence de la position du PA au sein du conjugué (linéaire et Y) sur sa distribution spatiale au sein des nanoparticules. Enfin, une étude comparative de libération du principe actif *in vitro*, entre les conjugués linéaire et les conjugués de structure Y, mais aussi entre les différents espaceurs utilisés, sera présentée.

## ***Chapitre I : Revue Bibliographique sur la Vectorisation***

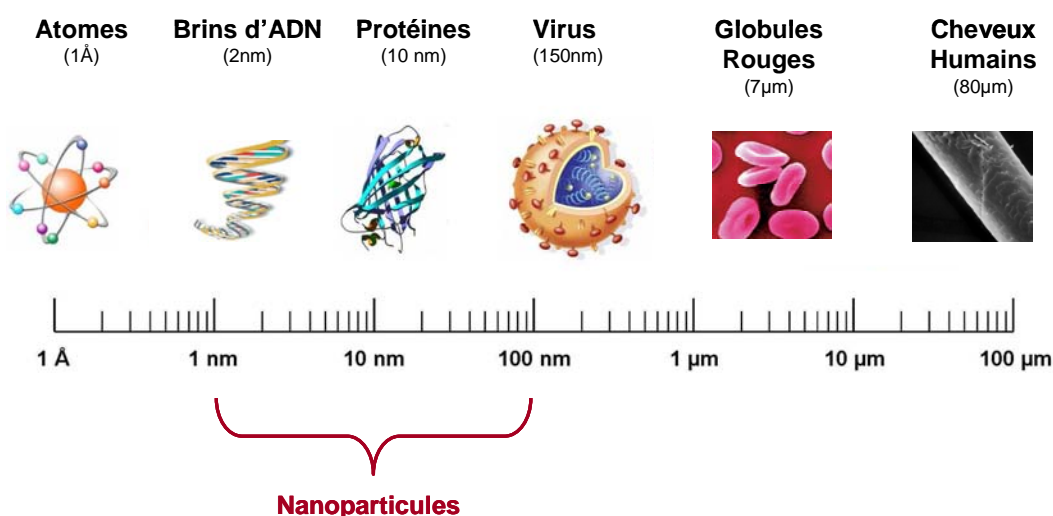


## I. Introduction

### 1. Importance des systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs

Depuis une trentaine d'années, l'intérêt des nanotechnologies dans le domaine biomédical n'a cessé de croître. Cette discipline offre des perspectives uniques pour la délivrance ciblée en imagerie médicale (diagnostic), en thérapie génique et pour l'administration d'agents thérapeutiques.<sup>[1-3]</sup> Le développement des nanotechnologies a permis de proposer le concept de vectorisation des médicaments à l'aide d'outils de taille nanométrique qui sont capables d'acheminer des principes actifs (destinés à la thérapie) ou des agents de contraste (destinés au diagnostic) vers leur site d'action.

Une nanoparticule est un assemblage d'atomes ou de molécules, formant un objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est compris entre 1 et 100 nm. A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure 1).<sup>[4]</sup>



**Figure 1 : Gamme de tailles des nanoparticules, en comparaison avec les principales structures chimiques et biologiques.<sup>[4]</sup>**

Une nanoparticule est également définie comme ayant « un diamètre suffisamment petit pour que les propriétés physiques et chimiques diffèrent de façon mesurable de celles des matériaux en vrac ».<sup>[4]</sup> La faible taille des nanoparticules leur confère des propriétés intéressantes. Elle offre en effet une importante surface spécifique et une grande stabilité. Ces particules ont effectivement l'avantage de former des dispersions qui ne sédimentent pas.

De nouveaux systèmes submicroniques de délivrance (nanoparticules), avec de nouvelles propriétés physico-chimiques (taille, propriété de surface, stabilité dans le milieu biologique...) et de nouveaux matériaux (polymères, lipides, métaux...), sont régulièrement élaborés et testés. Ces systèmes offrent une excellente opportunité pour l'administration de principes actifs présentant une toxicité importante ou une faible solubilité, voire une instabilité notable *in vivo*. La toxicité de ces principes actifs est généralement due à leur accumulation indésirable dans les tissus sains, entraînant dans plusieurs cas l'abandon du traitement. Les systèmes submicroniques sont capables non seulement de protéger les molécules actives (molécules chimiques, peptides, protéines, ADN, ARN) de la dégradation mais également de contrôler leur libération dans le temps et dans l'espace. De la même manière, le guidage d'un agent de contraste vers une région pathologique permet d'améliorer le diagnostic grâce à une meilleure qualité de l'imagerie médicale.

La conception d'outils submicroniques pour des applications biomédicales (nanomédecine) est un processus très complexe qui nécessite la compréhension et la maîtrise de différents aspects liés aux nanoparticules : aspects chimiques, physico-chimiques, biopharmaceutiques et pharmacologiques. La conception de nanovecteurs doit nécessairement répondre à deux principaux critères :

- (i) Les matériaux utilisés doivent être biodégradables et biocompatibles. Ils doivent pouvoir être éliminés par l'organisme et ne pas induire de réactions toxiques et/ou inflammatoires. En effet, l'accumulation et le stockage de certains matériaux dans l'organisme pourrait conduire à des effets toxiques pour les cellules (une toxicité par thésaurisme), en particulier après administration répétée de ces nanosystèmes.
- (ii) Ils doivent assurer l'encapsulation d'agents actifs, leur transport puis leur libération au niveau de la cible biologique.

Par ailleurs, la biodistribution des nanoparticules dans l'organisme est affectée par les caractéristiques physiques des nanovecteurs, incluant leur taille, leur forme et leur flexibilité, ainsi que par leurs caractéristiques chimiques. Ces nanoparticules se heurtent *in vivo* à différentes barrières biologiques. Le défi est sans doute de réussir à concevoir des nanoparticules capables de franchir ces barrières et d'acheminer l'agent actif vers son site d'action de manière efficace.

## ***2. Principales barrières à la vectorisation par voie intraveineuse***

Pour un effet thérapeutique bénéfique, les principes actifs, dans leur état libre ou incorporés au sein des nanoparticules, doivent atteindre leur site d'action. Cependant, il existe plusieurs barrières biologiques face à ces nanoparticules. Ces barrières peuvent être classées en trois catégories : les barrières externes (peau et muqueuse), la barrière sanguine et la barrière cellulaire.<sup>[5]</sup> Les barrières externes peuvent être évitées en optant pour une administration par voie intraveineuse, ce qui est compatible avec la taille nanométrique de la plupart des nanoparticules. En revanche, avec ce type d'administration, les nanoparticules se heurtent à plusieurs problèmes, tels que l'élimination rénale et hépatique, la déstabilisation, l'agrégation, l'opsonisation et l'élimination par le système phagocytaire mononucléaire (MPS).<sup>[2]</sup> Le MPS appartient au système immunitaire composé de cellules phagocytaires, tels que les monocytes dans le sang et les macrophages accumulés dans les nœuds lymphatiques, la rate et le foie (cellules de Küpffer).

### ***a. Influence de la taille des nanoparticules sur leur biodistribution***

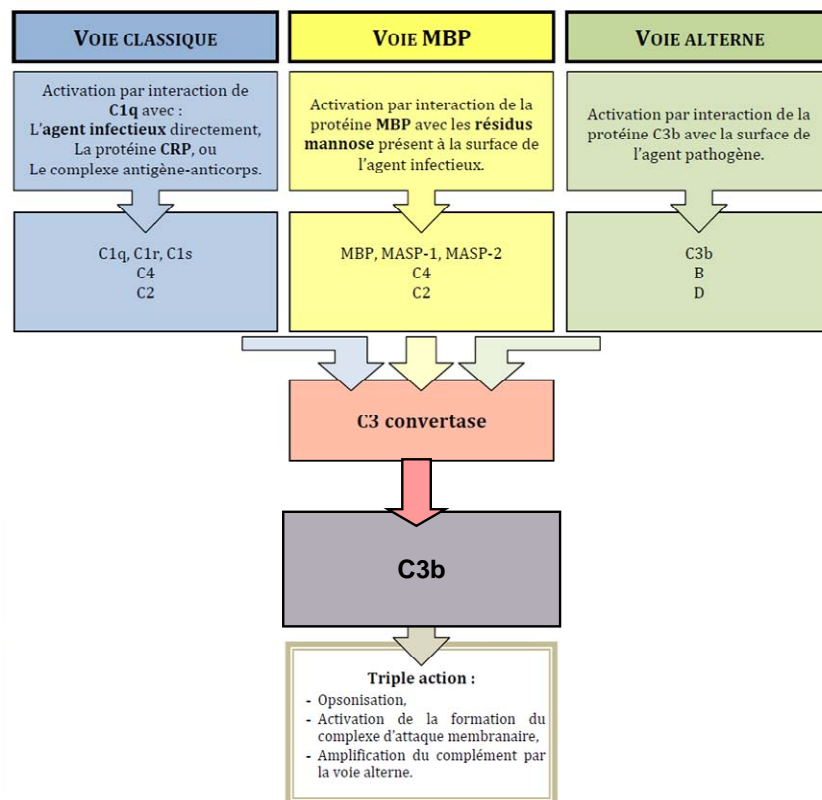
Les nanoparticules de taille inférieure à 10 nm sont rapidement éliminées du sang par filtration rénale («cutoff » rénal : ~ 10 nm en diamètre et ~ 48 kDa en masse moléculaire). L'élimination rénale peut affecter également les macromolécules dissociées des nanoparticules si leur masse moléculaire est inférieure à 48 kDa.<sup>[5]</sup>

L'opsonisation et la phagocytose par le MPS font partie des obstacles majeurs à la stabilité et la délivrance *in vivo* des nanoparticules. Les cellules phagocytaires du MPS sont capables d'internaliser les nanoparticules et ensuite les dégrader et les éliminer de l'organisme. La phagocytose n'est pas spécifique à ce type de nanoparticules, il s'agit d'une réponse normale du système immunitaire en présence de matériaux étrangers.

Le processus de phagocytose est gouverné par le phénomène d'opsonisation. Ce dernier phénomène consiste en l'adsorption d'opsonines (protéines plasmatiques) à la surface de corps étrangers. Cette adsorption permet au système immunitaire de reconnaître les corps étrangers et induit ainsi leur phagocytose. Le système d'opsonines est composé essentiellement par le complément du sérum (protéines plasmatiques).<sup>[6;7]</sup> D'autres protéines telles que l'immunoglobuline et la fibronectine peuvent aussi contribuer à ce processus d'opsonisation. Le complément, qui est primordial pour la reconnaissance d'agents

pathogènes, est constitué d'environ 30 protéines localisées dans le plasma, ou comme récepteurs à la surface de plusieurs cellules.

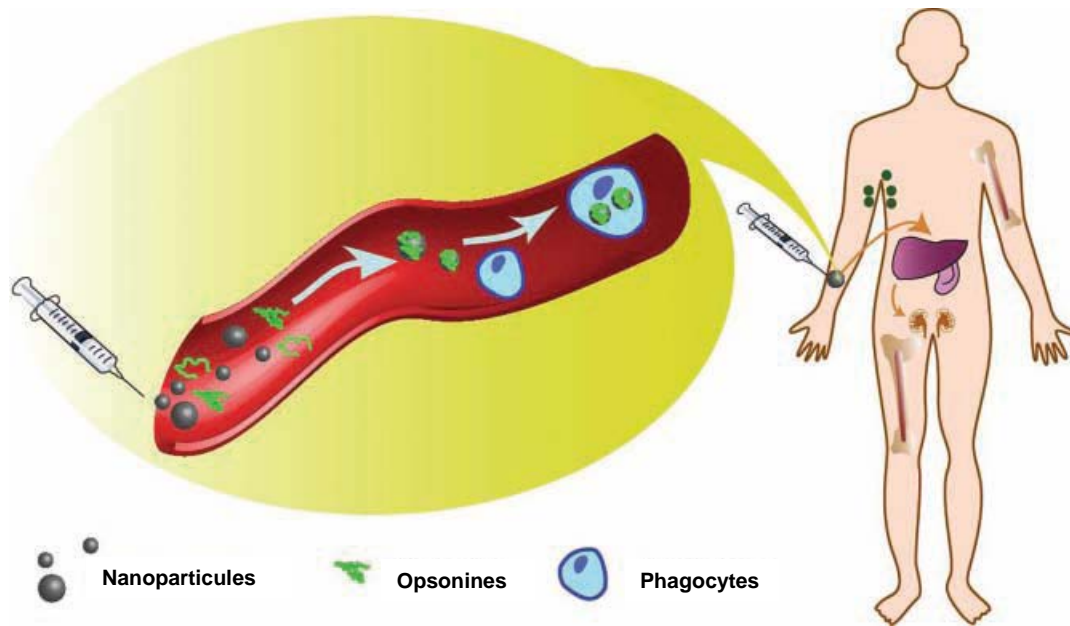
Lorsque certaines opsonines s'adsorbent à la surface d'un corps étranger, il en résulte l'activation du complément du sérum par différentes voies : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines (appelée aussi la voie MBP de l'anglais « *Mannose Binding Protein* ») (Figure 2).<sup>[8;9]</sup> Cette activation permet d'induire une cascade de transformations capable d'amplifier le phénomène d'opsonisation et la réponse immunitaire.



**Figure 2 : Schéma représentant les grandes étapes et l'action des différentes voies d'activation du complément.**

Lorsque la surface étrangère est recouverte d'opsonines dont la protéine C3b, cette dernière est reconnue par des récepteurs spécifiques, provoquant ainsi la phagocytose du complexe « corps étranger-C3b ». Cette reconnaissance spécifique se fait notamment par l'intermédiaire du récepteur CR1/CD35 présent en grande quantité à la surface des globules rouges. Ces derniers transportent les complexes immuns jusqu'au foie où ils sont phagocytés par les cellules de Küpffer, d'origine macrophagique. Une élimination des complexes opsonisés par C3b est également possible via les cellules phagocytaires circulantes (Figure 3).<sup>[9]</sup>





**Figure 3 : Elimination des nanoparticules par le MPS.<sup>[10]</sup>**

L'adsorption de ces protéines à la surface des nanoparticules peut potentiellement les déstabiliser, essentiellement dans le cas des micelles polymériques, et induire une libération rapide et prématurée de l'agent encapsulé.<sup>[11;12]</sup> Le principe actif peut ainsi causer une toxicité indésirable.

Les nanoparticules de grande taille (>200 nm) possèdent de faibles rayons de courbure, ce qui permet d'augmenter les interactions des opsonines à leur surface et d'accélérer leur élimination *in vivo*.<sup>[13]</sup> Ces nanoparticules sont ensuite capturées par le MPS.

Les nanoparticules de taille intermédiaire (20-100 nm) ont donc le plus grand potentiel pour des applications *in vivo*, parce qu'elles sont capables de circuler de manière prolongée dans le sang, lorsqu'elles sont conçues de façon appropriée. Ces nanoparticules sont assez larges pour éviter la filtration rénale et lymphatique et assez petites pour éviter l'opsonisation. De plus, dans cette gamme de taille, les nanoparticules semblent être plus facilement internalisées par les cellules.<sup>[14]</sup> Par ailleurs, elles sont capables de s'accumuler dans certains tissus avec une forte perméabilité vasculaire, tels que les tumeurs et les sites d'inflammation. Cette accumulation dans les tissus tumoraux est très utile pour maintenir des concentrations élevées en agent thérapeutique. L'accumulation est aussi favorisée par le faible drainage lymphatique au niveau des tumeurs. Ce phénomène est appelé l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention).<sup>[15]</sup> Ce phénomène sera discuté plus en détail dans la section suivante.

*b. Influence de la chimie de surface*

La charge de surface des nanoparticules est un paramètre important qui contribue à l'interaction non-spécifique des nanoparticules avec les cellules et les protéines plasmatiques. Les nanoparticules de charge positive sont rapidement éliminées par les cellules du MPS, à cause de leur interaction avec les protéines plasmatiques (par interactions électrostatiques) ce qui induit l'activation du complément.<sup>[16]</sup> Les surfaces cationiques interagissent aussi avec les phospholipides et les protéines de charge négative qui sont à la surface des membranes cellulaires. Cette interaction favorise la capture cellulaire des nanoparticules par endocytose ou par pénétration directe de la membrane cellulaire.<sup>[17]</sup>

L'opsonisation est également influencée par la balance hydrophile/hydrophobe des nanomatériaux. Ce processus est plus rapide lorsque les nanoparticules sont plus hydrophobes. En effet, les protéines plasmatiques s'adsorbent plus facilement à la surface des particules hydrophobes grâce à des interactions hydrophobes.<sup>[18;19]</sup>

La modification des propriétés de surface des nanoparticules à l'aide de certains polymères hydrophiles et neutres (ex. PEG) permet dans certains cas de minimiser le phénomène d'opsonisation.<sup>[20-22]</sup> Ceci permet donc aux nanoparticules de circuler plus longtemps dans le sang et atteindre le tissu tumoral de manière plus efficace. Les nanoparticules possédant une surface neutre et hydrophile semblent être les meilleurs candidats pour éviter la capture par les macrophages du MPS.<sup>[16]</sup>

**3. Accumulation tumorale des nanoparticules grâce à l'effet EPR**

Les nanoparticules qui évitent leur capture par le MPS sont capables d'atteindre le tissu tumoral après une circulation prolongée dans le sang. En théorie, le temps de circulation prolongée des nanoparticules leur permet une accumulation préférentielle dans certains sites biologiques, comportant des anomalies vasculaires (tumeurs et inflammations), grâce à l'effet EPR. Maeda *et al.*<sup>[15]</sup> ont bien décrit ce phénomène.

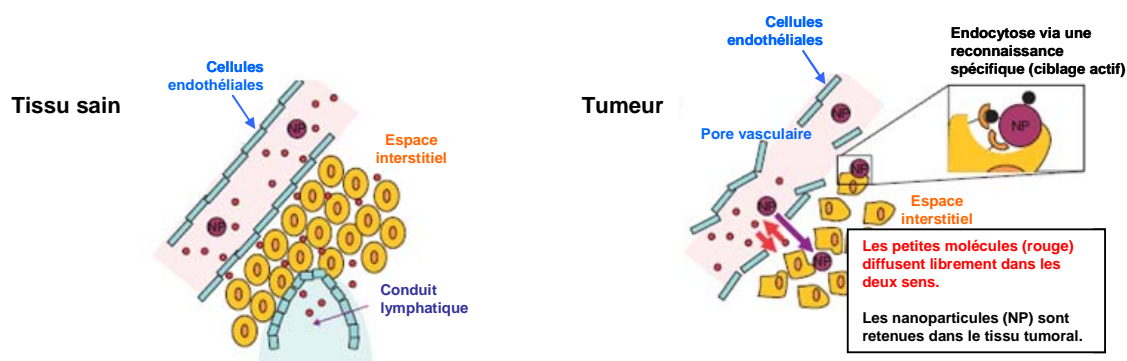
En effet, dans des conditions inflammatoires, la perméabilité des vaisseaux sanguins augmentent par l'action de différents agents (appelés généralement « facteurs ») agissant sur les cellules endothéliales et ouvrant les jonctions serrées intercellulaires. Parmi ces facteurs, nous citons la bradykinine, l'histamine, les prostaglandines, et le facteur de nécrose tumorale. Ce phénomène a été également démontré dans le cas d'infections microbiennes. Dans le cas

du tissu tumoral (cancer), il y a au moins deux facteurs qui modulent la perméabilité vasculaire : (i) le facteur de perméabilité vasculaire (VPF) et (ii) la bradykinine. Tous ces facteurs induisent une hypervascularisation du tissu tumoral, avec des vaisseaux présentant de larges fenestrations (ou pores).<sup>[15]</sup>

Les macromolécules de taille supérieure à 40 kDa et les nanoparticules, ayant un temps de circulation dans le sang prolongé, montrent une accumulation tumorale importante.<sup>[15]</sup> Une fois au niveau du site tumoral, les petites particules diffusent de manière significative à l'extérieur de la tumeur pour rejoindre de nouveau la circulation sanguine, d'où une plus faible accumulation tumorale en comparaison avec les grosses molécules.

En plus de la perméabilité des tissus tumoraux, il existe un deuxième facteur qui influence l'accumulation passive des macromolécules et nanoparticules au niveau de la tumeur. Les tissus tumoraux sont caractérisés par un plus faible drainage lymphatique, en comparaison avec les tissus sains.<sup>[15]</sup> Par conséquent, les macromolécules et les nanoparticules sont retenues pour une période de temps prolongée dans l'interstitium tumoral. La combinaison de ce faible drainage avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire au niveau de la tumeur donne naissance à l'effet EPR (Figure 4). Cet effet EPR est un phénomène général qui encourage le développement d'agents thérapeutiques macromoléculaire et de la nanomédecine.

Il est donc primordial de concevoir des nanoparticules capables d'éviter le phénomène d'opsonisation et d'acquiescer une circulation prolongée dans le sang, afin d'atteindre efficacement le tissu tumoral. Plusieurs stratégies ont été développées pour préparer ce type de nanoparticules appelées « furtives ». La méthode la plus utilisée est la couverture des nanoparticules par une couronne de PEG qui, par un effet de répulsion stérique, va empêcher l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules. L'ajout de ligands à la surface des nanoparticules permettrait, quant à lui, de reconnaître des récepteurs spécifiques afin de pouvoir délivrer l'agent thérapeutique à l'intérieur de la cellule cible (Figure 4). Tous ces aspects seront discutés plus en détails dans le cas des nanoparticules polymériques dans la section suivante.



**Figure 4 : Représentation schématique du ciblage passif et actif des nanoparticules via l'effet EPR. La différence entre le tissu sain et la tumeur met en évidence l'accumulation passive des nanoparticules.**<sup>[23]</sup>

A ce jour, plusieurs systèmes nanoparticulaires pour la délivrance de principes actifs ont été explorés. Ces nanoparticules diffèrent par les matériaux qui les composent (inorganiques, polymères, lipides...) et par la technique et les conditions de préparation. Parmi ces systèmes, nous pouvons citer les liposomes,<sup>[24]</sup> les micelles, les nanosphères, les nanocapsules, les dendrimères<sup>[25;26]</sup> et les nanotubes.<sup>[27]</sup>

Certains polymères naturels (protéines, polysaccharides) et de synthèse [poly(acide lactique), poly(cyanoacrylate d'alkyle), poly(éthylène glycol)...] répondent aux critères de biodégradabilité et/ou de biocompatibilité mentionnés précédemment. Ils occupent ainsi une place de choix pour le développement de nouvelles nanoparticules polymériques capables d'encapsuler le principe actif et de l'acheminer vers son site d'action, sans induire des réactions de toxicité. Dans la section suivante, nous focaliserons notre discussion sur les principaux nanovecteurs polymériques décrits dans la littérature.

#### **4. Nanoparticules polymériques**

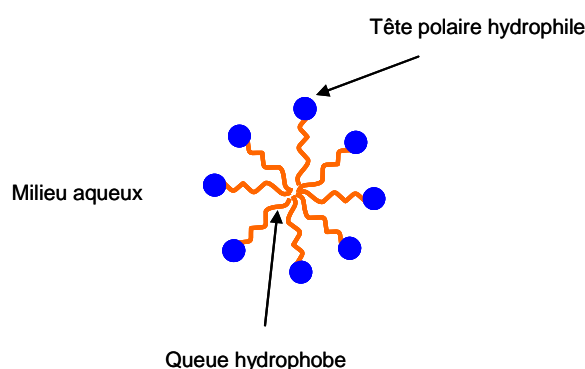
Les polymères ont attiré une grande attention pour leur capacité à s'auto-organiser en solution pour former des types variés de nanoobjets. Cette capacité à s'organiser est gouvernée par les propriétés physico-chimiques de ces polymères, en particulier la balance hydrophile/hydrophobe.

La plupart des nanoparticules polymériques utilisées en nanomédecine sont biocompatibles et biodégradables, elles sont propices à l'encapsulation et à la délivrance d'une gamme importante de molécules thérapeutiques. Parmi les polymères les plus utilisés pour la formation de nanoparticules, nous pouvons citer les gélatines, le chitosane, les copolymères poly(lactide-glycolide)s, le poly(lactide), le poly(glycolide) et les poly(cyanoacrylate

d'alkyle)s.<sup>[28-32]</sup> De plus, l'utilisation de copolymères à blocs, par exemple avec un bloc hydrophile et un bloc hydrophobe, permet d'obtenir des nanoparticules fonctionnalisées capables d'améliorer leur biodistribution. Dans ce contexte, le polymère poly(éthylène glycol) (PEG), bioinerte, a été lié de manière covalente ou par simple adsorption à la surface des nanoparticules. Ce revêtement polymérique semble réduire l'immunogénicité et limite la phagocytose des nanoparticules par le système réticuloendothéliale, ce qui augmente la concentration en principe actif dans les organes tels que le cerveau, les intestins et les reins.<sup>[33-37]</sup> Nous allons maintenant présenter les caractéristiques majeures des différentes formes de nanoparticules polymériques, à savoir les micelles, les nanosphères, les nanocapsules et les polymersomes.

#### *a. Les micelles*

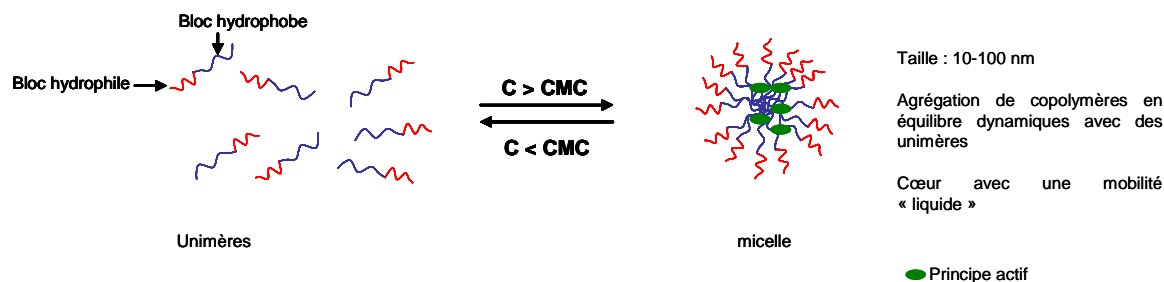
Les micelles sont des agrégats de morphologie sphérique de molécules amphiphiles, généralement des tensioactifs, dont la tête polaire hydrophile est au contact de l'eau tandis que les parties hydrophobes sont regroupées et dirigées vers l'intérieur afin de minimiser leur contact avec l'eau (Figure 5).



**Figure 5 : Représentation d'une micelle formée par des tensioactifs.**

Les micelles polymériques se forment à partir de copolymères à blocs amphiphiles, possédant une partie hydrophile et une autre hydrophobe. Ces copolymères peuvent s'auto-assembler dans un milieu aqueux, comme les tensioactifs, pour former des structures nanoparticulaires avec un cœur hydrophobe et une couronne hydrophile. En effet, les macromolécules amphiphiles s'orientent de manière à déplacer la partie hydrophobe de l'environnement aqueux, afin d'atteindre un état d'énergie libre minimale. Lorsque la concentration des copolymères amphiphiles augmente, l'énergie libre du système commence à augmenter à cause des interactions défavorables entre les molécules d'eau et la région hydrophobe de

l'amphiphile. Il en résulte une structuration de l'eau environnante, suivie d'une diminution de l'entropie.<sup>[38]</sup> A une certaine concentration spécifique, appelée la concentration micellaire critique (CMC), plusieurs copolymères amphiphiles vont s'auto-assembler en particules colloïdales appelées micelles (Figure 6). Il est à noter que ces objets sont en équilibre dynamique avec les copolymères amphiphiles libres (« unimères »).



**Figure 6 : Représentation de copolymères amphiphiles isolés et auto-associés en milieux aqueux et les caractéristiques générales d'une micelle polymérique.**

En comparaison avec les micelles de tensioactifs, les micelles polymériques sont généralement beaucoup plus stables et se forment à des CMC remarquablement inférieures à celles des tensioactifs classiques ( $10^{-4}$  -  $10^{-3}$  mM vs 0.1 - 1 mM).<sup>[39]</sup> De plus, dans certain cas de dilution, ces micelles résistent au désassemblage à cause des interactions physiques entre les chaînes dans le cœur de la micelle.<sup>[40]</sup>

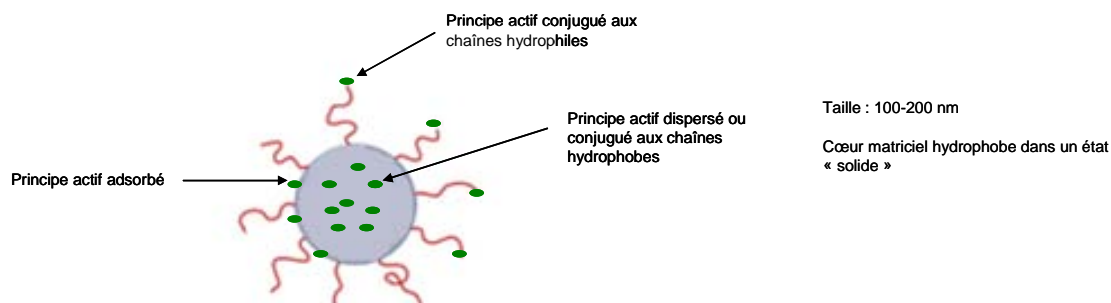
Les micelles ont typiquement des diamètres entre 10 et 100 nm et sont caractérisées par une architecture « cœur-couronne ». Ils sont généralement utilisés pour la solubilisation des molécules thérapeutiques lipophiles (Figure 6). La conformation de la couronne hydrophile supprime stériquement le phénomène d'opsonisation, par conséquent les micelles résistent à la phagocytose par les macrophages et diminuent leur élimination par le système réticuloendothélial (RES), permettant des temps de circulation prolongés.<sup>[41-43]</sup> Le PEG est le polymère hydrophile le plus utilisé pour la préparation des micelles polymériques.<sup>[44;45]</sup> Quant au cœur hydrophobe des micelles, le développement est axé essentiellement sur les polymères biodégradables, tels que les polyesters.<sup>[44;46]</sup> Genexol-PM<sup>®</sup> est un exemple important d'une formulation micellaire de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1750</sub> encapsulant le paclitaxel. Cette formulation permet d'éviter l'utilisation du tensioactif CremophorEL et de l'éthanol pour l'administration du paclitaxel et de réduire ainsi la toxicité qui en résulte.<sup>[45]</sup> D'autres types de micelles, sensibles à l'environnement, ont été développés. A titre d'exemple, des copolymères sensibles au pH ont été utilisés pour la préparation de micelles. Parmi ces copolymères, il y a le mPEG-Poly(2-vinyle pyridine) (mPEG-PVP), qui possède un pH critique, qui correspond

au pKa de la chaîne de PVP, de l'ordre de 5.<sup>[47]</sup> En effet, à pH inférieur à 5, les micelles sont déstabilisées en « unimères », à cause de la protonation des fonctions amines de la chaîne de PVP qui devient soluble dans l'eau. Ce type de micelles peut donc servir pour délivrer des principes actifs au niveau des tumeurs et de les libérer dans le milieu intracellulaire qui possède un environnement acide (pH ~ 5). D'autres micelles sensibles à la lumière attirent actuellement beaucoup d'intérêt pour leur utilisation pour la délivrance de principes actifs. Cette photosensibilité est rendue possible grâce à l'incorporation de différents photochromes, tels que l'azobenzène, le spiropyrane, le dithienyléthène, la diazonaphthoquinone et le stilbène.<sup>[48]</sup>

Cependant, l'inconvénient majeur des micelles est leur sensibilité à la dilution. Ils sont également facilement déstabilisés *in vivo*. Dans plusieurs cas, après injection intraveineuse, le principe actif encapsulé dans les micelles se retrouve libéré trop rapidement dans le sang (en quelques minutes).<sup>[44]</sup>

#### b. Les nanosphères

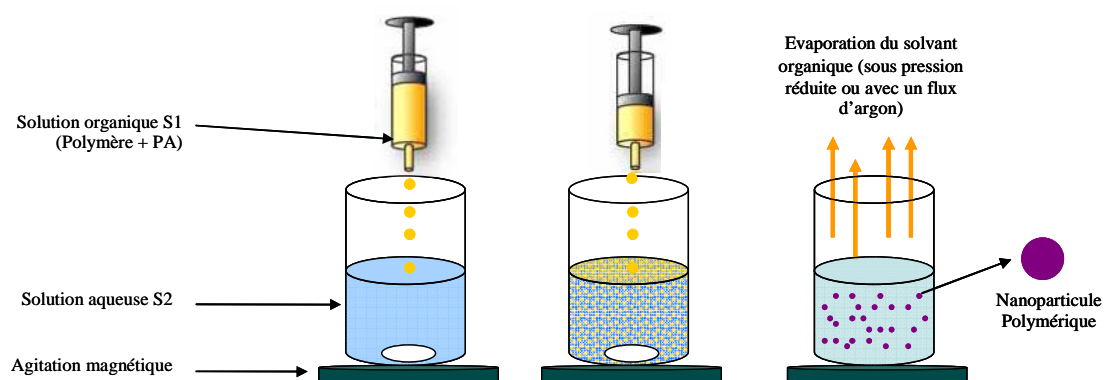
Une nanosphère polymérique peut être définie comme étant une particule colloïdale solide dans laquelle les molécules thérapeutiques sont dissoutes, piégées, encapsulées, liées chimiquement ou adsorbées à la matrice polymérique (Figure 7).<sup>[49]</sup> Ces nanoparticules sont généralement plus grandes que les micelles, avec des diamètres compris entre 100 et 200 nm. Le caractère solide de la matrice polymérique confère à ces nanoparticules une grande stabilité, en comparaison avec les micelles polymériques. Les polymères utilisés pour la préparation de ces nanosphères peuvent être des polymères naturels (biopolymères) ou des polymères synthétiques dégradables ou non dégradables.



**Figure 7 : Représentation d'une nanosphère polymérique et ses caractéristiques générales.**

La préparation des nanosphères polymériques peut se faire selon deux méthodes générales, soit par polymérisation directe des monomères en émulsion [ex. le poly(méthyle

méthacrylate) et le poly(éthyle cyanoacrylate)], soit en partant d'un polymère préformé. Si le polymère est préformé, comme dans le cas des polyesters, les nanosphères peuvent être préparées par les méthodes suivantes : émulsion/évaporation de solvant, effet de sel « Salting-out » et émulsion/diffusion de solvant. Mais, la méthode la plus utilisée est la nanoprécipitation (Figure 8).<sup>[50;51]</sup> Cette dernière méthode consiste à dissoudre le polymère et le principe actif dans un solvant organique miscible à l'eau, puis d'ajouter goutte-à-goutte ce mélange à un milieu aqueux (contenant ou non des tensioactifs). Le solvant organique diffuse alors dans toute la solution aqueuse, ce qui conduit à une précipitation du polymère, et donc à la formation de nanosphères.



**Figure 8 : Préparation des nanoparticules par la méthode de nanoprécipitation.**

Il est important également de noter qu'une distinction nette entre micelles et nanosphères formées à partir de copolymères amphiphiles n'est pas toujours possible. Davis *et al.* ont exploré, en utilisant des copolymères de mPEG-PLA, les effets de l'augmentation de la longueur de la chaîne hydrophobe (PLA) sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules formées.<sup>[52;53]</sup> Ils ont pu montrer que l'augmentation de la longueur de chaîne de PLA rend le cœur central des nanoparticules de plus en plus « solide », donnant lieu à des nanosphères compactes, alors que des blocs de PLA plus courts permettent d'obtenir des assemblages de type « micelles ».<sup>[52]</sup>

La capture des nanosphères par le système phagocytaire mononucléaire (MPS) est inévitable. Ils s'accumulent donc essentiellement dans le foie et la rate. Ce phénomène est dû en effet à l'opsonisation des protéines sanguines à la surface hydrophobe de ces nanosphères. Il semble important donc de modifier leur surface pour qu'elles soient invisibles au MPS et qu'elles puissent circuler dans le sang plus longtemps. Cette approche sera discutée plus en détails dans la section suivante.



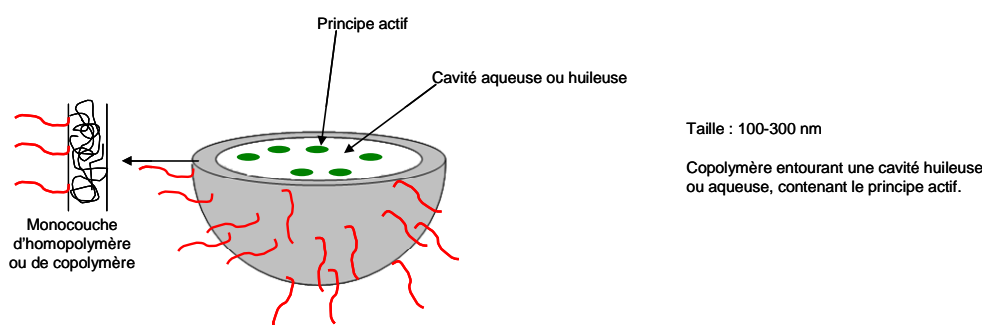
Plusieurs types de nanosphères ont notamment été étudiés dans le domaine de la vectorisation d'anti-cancéreux. A titre d'exemple, des nanosphères à base de PLA, de poly(vinyle pyrrolidone) ( $D \sim 50-60$  nm) ou de chitosane ( $D \sim 100$  nm) ont été développées. Le principe actif est généralement encapsulé de manière physique dans le cœur hydrophobe de ces nanoparticules, ou conjugué chimiquement avec la partie hydrophobe, tel que le paclitaxel-PLA, ou avec la partie hydrophile, tel que le dextran-doxorubicine.<sup>[2]</sup>

L'abraxane<sup>®</sup> fait partie de l'une des avancées majeures dans le domaine de vectorisation par des nanoparticules.<sup>[54]</sup> Il s'agit en effet de nanoparticules d'albumine d'un diamètre moyen de l'ordre de 130 nm encapsulant le paclitaxel. Cette formulation a permis d'améliorer significativement l'efficacité (ou l'indice) thérapeutique du paclitaxel, en comparaison avec la formulation classique à base de solvants (paclitaxel+CremophorEL+éthanol).

### c. Les nanocapsules et les polymersomes

Les nanocapsules et les polymersomes polymériques sont des systèmes vésiculaires de taille colloïdale. La taille des nanocapsules est située généralement entre 100 et 300 nm.<sup>[55]</sup> En revanche, la taille des polymersomes peut varier entre 5 nm et 5  $\mu$ m.<sup>[55;56]</sup>

Les nanocapsules sont composées d'une monocouche mince de polymère, entourant une cavité huileuse dans la majorité des cas. Le principe actif est confiné dans la cavité interne entouré par une mince paroi de polymère (Figure 9).<sup>[57]</sup>

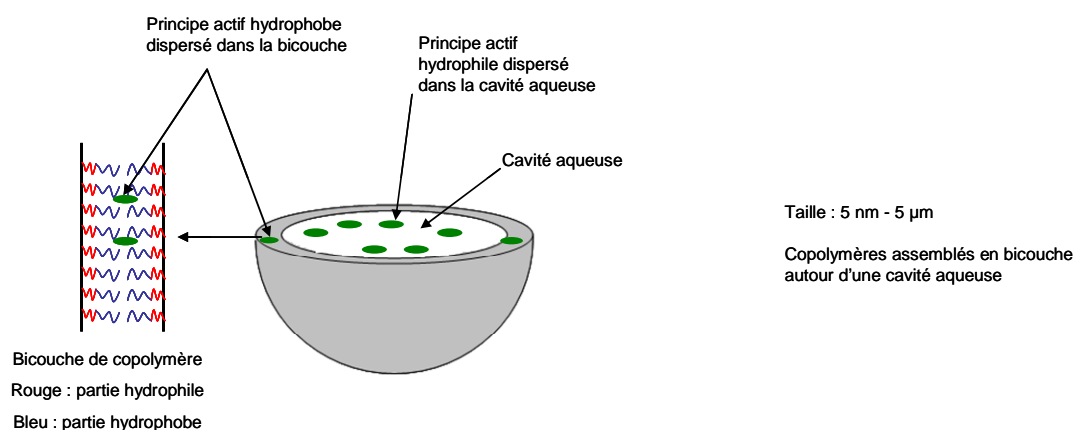


**Figure 9: Représentation d'une nanocapsule et ses caractéristiques générales.**

La méthode la plus utilisée pour produire des nanocapsules est le dépôt interfacial de polymères préformés.<sup>[58]</sup> Dans cette procédure, une solution de principe actif et de polymère dans un solvant organique (ex. acétone) miscible à l'eau est préparée. A cette solution, une huile (ex. triglycérides) miscible au solvant organique mais non-miscible au mélange est ajoutée, et la solution est dispersée dans une phase aqueuse contenant des tensioactifs (ex.

Poloxamer). Sous agitation modérée, le solvant organique diffuse dans la phase aqueuse et le polymère s'agrège autour des gouttelettes huileuses, conduisant à la formation de nanocapsules.<sup>[58]</sup> Les polymères utilisés dans la préparation des nanocapsules comprennent les homopolymères de polyesters tels que PLA, PLGA et PCL. Des copolymères de mPEG-PLA ont été également utilisés ces dernières années pour éviter le phénomène d'opsonisation.<sup>[59]</sup> Ces systèmes permettent l'encapsulation et la délivrance de principes actifs hydrophobes, tel que l'anti-œstrogène RU58668.<sup>[59]</sup> Des nanocapsules avec une cavité aqueuse ont également été développées pour la délivrance d'Oligonucléotides (ODN).<sup>[31]</sup>

Les polymersomes, quant à eux, sont constitués d'une cavité aqueuse entourée d'une bicouche de polymère amphiphile, ressemblant ainsi à la structure des liposomes (Figure 10).<sup>[56]</sup> Ces nanoparticules sont généralement obtenues par la méthode de « réhydratation de film ». Le copolymère amphiphile est dissout dans un solvant organique volatil qui est évaporé pour obtenir un film de polymère. Le film est ensuite réhydraté avec une phase aqueuse sous forte agitation, sonication ou extrusion, conduisant à la formation de polymersomes avec une étroite distribution.<sup>[60-62]</sup> Les copolymères les plus utilisés pour la préparation de polymersomes sont les diblocs mPEG-PBD (polybutadiène) et mPEG-PEE (polyéthyléthylène).<sup>[60]</sup> Ces matériaux sont bioinertes mais non biodégradables, donc en alternative, des recherches ont portées sur l'utilisation de polyesters « pegylés », tels que mPEG-PLA et mPEG-PCL, chacun comme unique constituant des vésicules ou mélangé avec mPEG-PBD.<sup>[62;63]</sup>



**Figure 10 : Représentation d'un polymersome et ses caractéristiques générales.**

Contrairement aux nanocapsules, il est possible d'encapsuler deux types de principes actifs dans les polymersomes : les principes actifs hydrophobes dans la bicouche polymérique et les principes actifs hydrophiles dans la cavité aqueuse. Cette propriété a été mise en œuvre par

Discher *et al.* pour encapsuler conjointement le paclitaxel (hydrophobe) dans la bicouche et la doxorubicine (hydrophile) dans la cavité aqueuse, et ce dans le but d'augmenter l'efficacité anti-cancéreuse.<sup>[64]</sup> L'inconvénient majeur des polymersomes reste leur instabilité. De plus, l'encapsulation passive utilisée requiert une quantité importante de molécules actives.

## **II. Utilisation du PLA pour la préparation de nanoparticules matricielles**

### ***1. Le PLA, un polymère biodégradable***

Comme nous l'avons mentionné précédemment, les nanomatériaux destinés à être administrés chez l'homme ou chez l'animal doivent nécessairement être biodégradables et biocompatibles. Ils doivent pouvoir être éliminés par l'organisme sans induire de réactions toxiques. Un petit nombre de polymères naturels (protéines, polysaccharides) ont été utilisés pour concevoir des nanoparticules dans le but d'administrer des agents thérapeutiques. C'est l'exemple du système commercial « Abraxane<sup>®</sup> », qui est constitué d'albumine et encapsulant le paclitaxel.<sup>[54]</sup>

Par ailleurs, quelques polymères synthétiques ont été développés pour des applications en nanomédecine. Parmi ces polymères qui répondent aux critères de biodégradabilité, de biocompatibilité et/ou de bioélimination, les plus utilisés sont les polyesters (PLA, PLGA, PCL), les polyacrylates (PACA), les poly(aminoacide)s [poly(acide malique), poly(benzyl glutamate)] et les poly(éther) (PEG).

Le caractère biocompatible et biodégradable du PLA l'a rendu très attractif pour plusieurs applications et en particulier dans le domaine biomédical (Figure 11). Il est en effet utilisé depuis une quarantaine d'années en chirurgie (fils de suture et agrafes, punaises et prothèses en orthopédie, etc.). Le PLA est aussi très intéressant pour la délivrance de molécules thérapeutiques. En effet, en milieu biologique le PLA est hydrolysé en acide lactique. Ce dernier est ensuite introduit dans le cycle de Krebs et éliminé.<sup>[65;66]</sup> De plus, les produits de dégradation du PLA ne sont pas toxiques, ce qui le place comme un choix naturel pour les applications médicales.<sup>[65]</sup> La FDA a également approuvé le PLA en contact direct avec les fluides biologiques (Figure 11).<sup>[67]</sup>

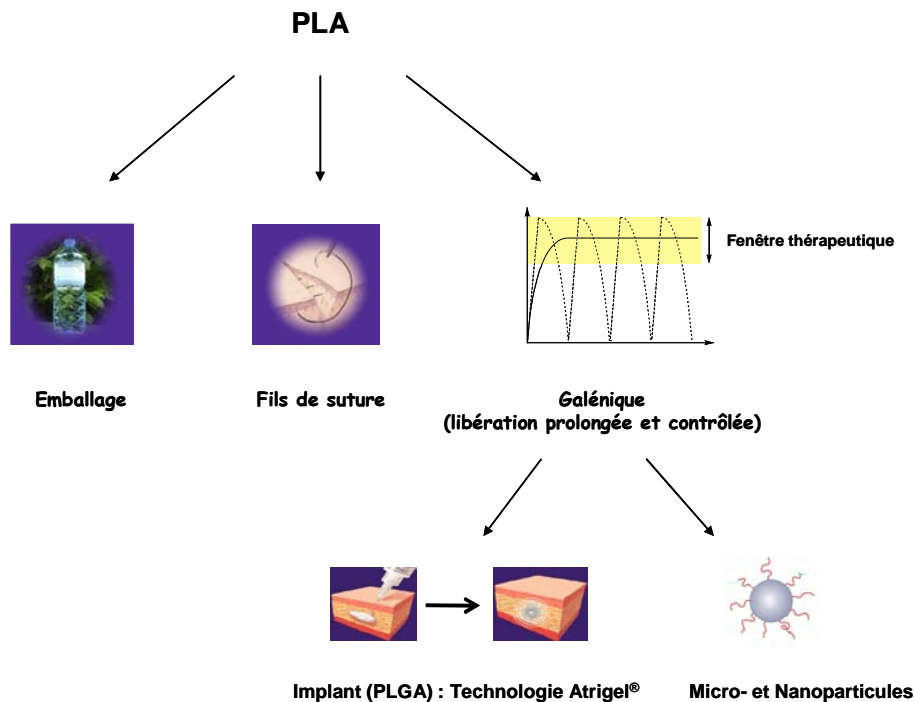


Figure 11 : Quelques applications du PLA.

Le PLA a été découvert en 1932 par Carothers (entreprise DuPont). L'acide lactique, unité monomérique du PLA, est produit soit par fermentation du sucre (issu du maïs) soit par voie pétrochimique. Comme l'approche de fermentation est plus écologique, cette dernière a été largement plus utilisée depuis les années 1990. Dans le processus de fermentation, une souche optimisée de *Lactobacillus* est utilisée pour convertir l'amidon de maïs en acide lactique. Cette fermentation permet de produire presque exclusivement l'isomère *L* de l'acide lactique (99.5%).<sup>[67;68]</sup> La préparation de PLA se fait classiquement par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du lactide cyclique (dimère cyclique de l'acide lactique) (Figure 12). Cette méthode permet d'atteindre des masses moléculaires très élevées (>100 kDa) avec un bon contrôle. La synthèse peut se dérouler en solution ou en masse. Le catalyseur le plus utilisé pour la préparation de PLA est l'octanoate d'étain, qui permet d'avoir un faible taux de racémisation à haute température. Il a également une faible toxicité et il est accepté par la FDA.<sup>[69]</sup> D'autres systèmes catalytiques seront discutés dans le Chapitre II.

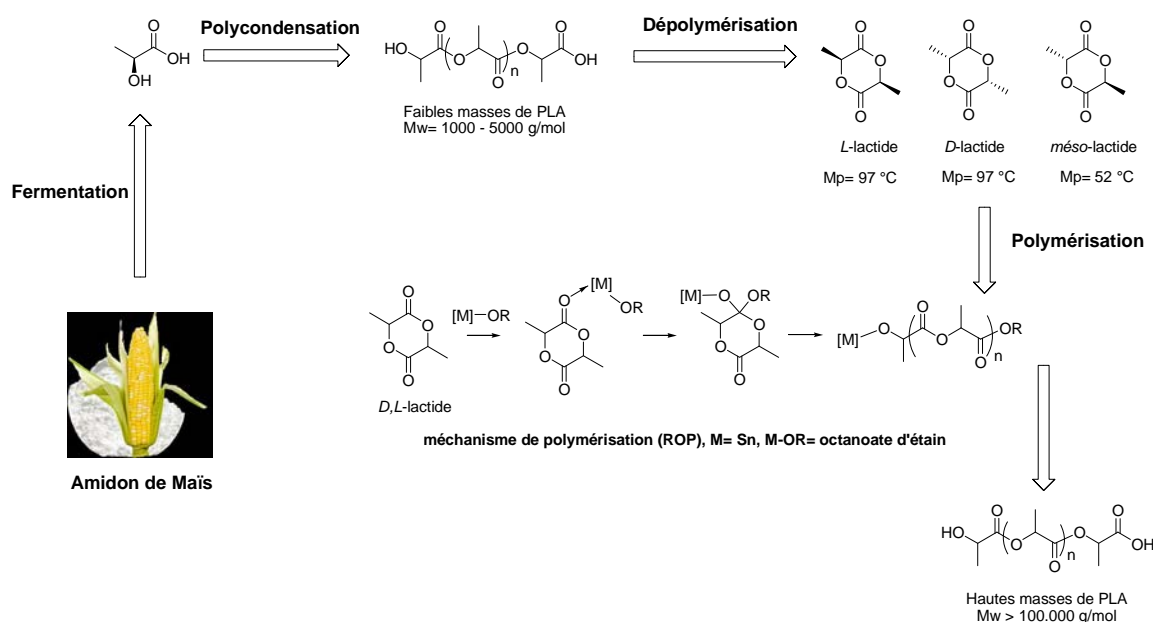


Figure 12 : Etapes actuelles de production du PLA.

L'utilisation du PLA, en particulier en nanomédecine, nécessite la compréhension de ses mécanismes de biodégradation. Ce polymère existe sous trois formes stéréochimiques : *L*-PLA, *D*-PLA et *D,L*-PLA. Les *L*-PLA et *D*-PLA sont semi-cristallins, contrairement au *D,L*-PLA qui est amorphe et qui présente une distribution aléatoire de deux isomères d'acide lactique (*D* ou *L*). Plusieurs études ont montré que la partie cristalline de PLA résiste beaucoup plus à la biodégradation en comparaison avec la partie amorphe. La vitesse de dégradation diminue avec l'augmentation de la cristallinité et de la masse moléculaire.<sup>[70]</sup> Cette dégradation s'effectue selon un mécanisme hydrolytique (hydrolyse par voie chimique et enzymatique). Ce mécanisme est hétérogène (plus rapide à l'intérieur qu'à la surface) à cause d'un effet autocatalytique en masse induit par les groupements carboxyliques terminaux.

Le PLA, biocompatible et biodégradable, semble donc un très bon candidat pour la préparation de nanoparticules polymériques pour l'encapsulation et la vectorisation de principes actifs. Son caractère hydrophobe lui permet en effet de s'auto-associer en milieu aqueux par interactions hydrophobes et d'encapsuler une grande variété de principes actifs de faible solubilité (ex. taxanes, tamoxifène).<sup>[44;71;72]</sup> Cette encapsulation peut être physique (interactions hydrophobes) ou covalente (couplage avec la chaîne de PLA).

## 2. Nanoparticules à base de PLA

### a. Vecteurs de 1<sup>ère</sup> génération - ciblage passif du système phagocytaire mononucléaire

Les nanosphères constituent comme décrit précédemment un système matriciel de polymère assez compact dans lequel le principe actif est encapsulé. Depuis une vingtaine d'années, d'importants progrès ont été réalisés concernant le développement de nanosphères à base de PLA pour l'administration *in vivo*. La première génération de nanosphères était composée uniquement de l'homopolymère PLA ou de son dérivé PLGA (Figure 13).

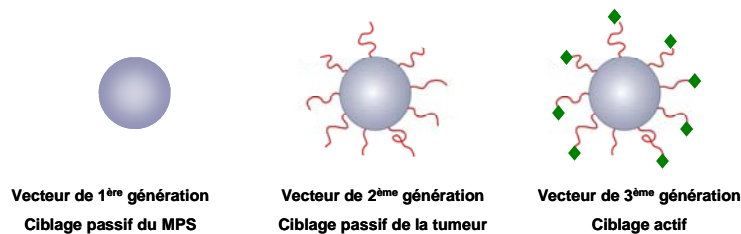


Figure 13 : Différentes générations de nanoparticules polymériques.<sup>[20;73;74]</sup>

Vu le caractère hydrophobe du PLA, l'utilisation d'un tensioactif est nécessaire pour permettre la stabilisation de ces nanoparticules.<sup>[55;75;76]</sup> Le PLA utilisé dans la préparation de ces nanoparticules est généralement synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du monomère cyclique *D,L*-lactide, en utilisant l'octanoate d'étain comme catalyseur.

La préparation de ces nanoparticules est généralement effectuée en deux étapes par la méthode : « émulsification/évaporation de solvant ».<sup>[55]</sup> La première étape consiste à former une émulsion huile-dans-eau (O/W). La taille des gouttelettes formant l'émulsion dépend de la méthode utilisée (le processus mécanique est le plus utilisé) et des conditions de préparation (rapport phase organique/phase aqueuse, tensioactifs, température, pression, cycles d'homogénéisation...).<sup>[55]</sup> La phase organique solubilisant le polymère et le principe actif doit être immiscible à l'eau et volatile. Le dichlorométhane et le chloroforme ont été largement utilisés dans le passé, mais sont actuellement remplacés par l'acétate d'éthyle (AcOEt) qui offre un meilleur profil toxicologique. La phase aqueuse, quant à elle, contient généralement le Pluronic F68 comme tensioactif, permettant ainsi la stabilisation des nano-émulsions et des nanoparticules par la suite. La deuxième étape consiste à évaporer le solvant organique pour obtenir des nanoparticules « solides » dans la phase aqueuse. Les

nanoparticules obtenues ont généralement une taille de l'ordre de 150 nm, et parfois supérieure à 250 nm.<sup>[55]</sup>

Une deuxième méthode a été également utilisée pour préparer ces nanoparticules : « émulsification/déplacement de solvant ».<sup>[55]</sup> Dans ce cas, le solvant organique utilisé est partiellement miscible à l'eau (acétate d'éthyle, acétate d'isopropyl, alcool benzylique...) et permet de solubiliser le polymère et le principe actif. L'émulsification (O/W) est atteinte en saturant la phase aqueuse avec le solvant organique. Cette émulsification peut être stabilisée en utilisant certains tensioactifs, tels que le Pluronic F68 ou la lécithine de soja. Il se forme ainsi des gouttelettes huileuses dans la phase aqueuse. Ensuite, le solvant organique se déplace vers la phase aqueuse en diluant l'émulsion avec un grand volume d'eau, donnant lieu à des nanoparticules polymériques. Le solvant organique est ensuite évaporé de manière plus facile en comparaison avec la première méthode.<sup>[55]</sup> Comme dans le cas de la méthode « d'émulsification/évaporation de solvant », la taille des nanoparticules dépend essentiellement des conditions de préparation. Généralement, leur diamètre est de l'ordre de 150 nm.<sup>[55]</sup>

Les nanosphères de première génération montrent généralement un temps de circulation dans le sang relativement court. En effet, les opsonines s'adsorbent à leur surface, ce qui induit leur reconnaissance par le système phagocytaire mononucléaire (MPS) et leur élimination de la circulation sanguine par phagocytose grâce aux macrophages.<sup>[75]</sup> Dans une étude d'Allemann *et al.*, il a été reporté que lorsque les nanoparticules conventionnelles de PLA sont incubées dans le sérum et le plasma humain, les opsonines C3, l'anticorps IgG, l'albumine et l'apolipoprotéine-E s'adsorbent à la surface des nanoparticules.<sup>[77]</sup>

Une capture réduite a été décrite pour quelques nanoparticules hydrophobes et non-biodégradables stabilisées par des tensioactifs.<sup>[78;79]</sup> Ces derniers semblent offrir une couronne hydrophile aux nanoparticules, permettant ainsi la réduction du phénomène d'opsonisation. Concernant les particules à base de PLA stabilisées par des tensioactifs ou entourées d'albumine, la capture est très rapide et leur demi-vie dans le sang ne dépasse pas 2 minutes.<sup>[20;73;80]</sup> Après injection, les nanovecteurs de première génération s'accumulent essentiellement dans les organes MPS tels que le foie et la rate. Ceci pourrait être très utile pour cibler par exemple les macrophages du foie et de la rate.<sup>[81-83]</sup>

L'idée de modifier les propriétés de surface de ces nanoparticules afin de réduire le phénomène d'opsonisation pour atteindre d'autres sites d'action s'est donc logiquement imposée. La modification de surface des nanoparticules polymériques biodégradables a été faite principalement par deux méthodes : (i) recouvrement de la surface par des polymères hydrophiles ou par des tensioactifs, et (ii) développement de polymères biodégradables avec des segments hydrophiles. Parmi ces matériaux, les plus utilisés sont : le poly(éthylène glycol) (PEG), le poloxamer, la poloxamine, le polysorbate (Tween 80) et les carbohydrates. Dans le cas de nanoparticules à base de PLA, la méthode la plus utilisée est sans doute la « PEGylation » (utilisation du PEG, biocompatible, pour recouvrir les nanoparticules) qui leur permet de conférer un caractère « furtif » vis-à-vis du système immunitaire et ainsi prolonger leur temps de circulation dans le sang et atteindre plus efficacement les organes cibles. Ce type de nanoparticules est appelé communément « vecteurs de deuxième génération ».<sup>[20;80]</sup>

*b. Vecteurs de 2<sup>ème</sup> génération - ciblage passif de la tumeur*

Afin de cibler d'autres organes que le MPS, il faut satisfaire trois conditions : (i) éviter l'opsonisation grâce au recouvrement des nanoparticules par des chaînes hydrophiles, (ii) cibler un endothélium perméable (zones inflammatoires, tumeurs,...) et (iii) adapter la taille des nanovecteurs, typiquement 10 – 200 nm. Comme nous l'avons expliqué précédemment, les nanoparticules doivent avoir une taille supérieure à 10 nm afin d'éviter le premier passage d'élimination via les reins,<sup>[84]</sup> et inférieure à 200 nm pour éviter le phénomène d'opsonisation suivi par la phagocytose des nanoparticules par le MPS.<sup>[13]</sup>

Deux approches ont été étudiées concernant le concept de « PEGylation » : la première approche consiste en une simple adsorption de chaînes de PEG à la surface des nanoparticules de PLA. Cependant, il a été démontré que ce type d'assemblage [adsorption de Poloxamers (PEG)] n'est pas efficace pour prolonger leurs temps de circulation.<sup>[20;80]</sup> En revanche, la deuxième approche qui consiste à lier de manière covalente les chaînes de PEG à la surface des nanoparticules de PLA semble être plus judicieuse. En effet, ce type d'assemblage permet d'éviter la désorption des chaînes hydrophiles et de garder ainsi des propriétés de surface intéressantes vis-à-vis de la circulation des nanoparticules (Figure 13).<sup>[20;22;73]</sup>

Pour obtenir des nanoparticules à base de PEG-PLA avec une structure « cœur-couronne », un copolymère PEG-PLA est généralement synthétisé par ROP du monomère cyclique *D,L*-lactide, en utilisant la chaîne de PEG-OH comme macroamorceur et l'octanoate d'étain



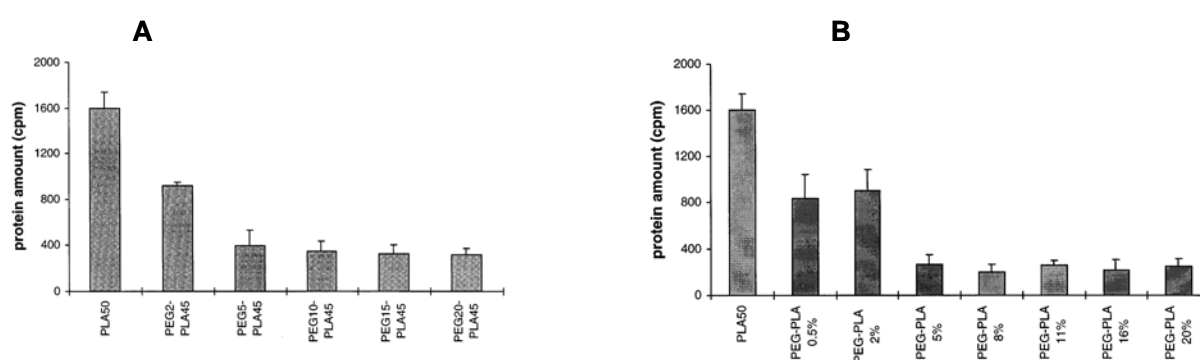
comme catalyseur.<sup>[85]</sup> Ces deux blocs ont une tendance à former facilement une séparation de phase en présence d'eau (PEG hydrophile et PLA hydrophobe).<sup>[86]</sup> Le copolymère amphiphile préformé peut conduire à la formation de nanoparticules principalement selon deux techniques : nanoprécipitation<sup>[58;87]</sup> ou émulsification/évaporation de solvant.<sup>[88]</sup>

En utilisant la méthode de nanoprécipitation, le copolymère (avec le principe actif) est dissout dans un solvant miscible à l'eau (THF ou acétone). Cette solution est ensuite versée goutte à goutte dans une solution aqueuse contenant ou non un tensioactif. Il se forme ainsi des nanosphères de diamètre entre 25 et 160 nm avec une étroite distribution monomodale, en fonction de la taille et de la concentration (jusqu'à 20 mg/ml) du copolymère PEG-PLA.<sup>[52]</sup> Grâce au caractère amphiphile du copolymère, aucun agent de stabilisation n'est nécessaire dans le milieu de préparation. Cependant, l'utilisation de tensioactifs permet de préserver les nanoparticules de l'aggrégation pendant de longues périodes de stockage.<sup>[55]</sup>

La préparation par la méthode d'émulsification/évaporation décrite précédemment permet d'obtenir des nanosphères avec un cœur hydrophobe de PLA et une couronne hydrophile de PEG. Le principe actif hydrophobe est piégé dans le cœur de PLA. La taille des nanoparticules dépend donc de la taille des gouttelettes formant l'émulsion (20 – 150 nm), qui est fonction de la viscosité de la solution du polymère et de la méthode utilisée pour réaliser cette émulsification (agitation, ultrasons, micro-fluidisation).<sup>[89]</sup> L'utilisation de tensioactifs dans ce cas permet de faciliter la formation des petites gouttelettes, et donc des nanoparticules plus petites. Mais, il semble que la présence de tensioactif réduit la demi-vie des nanoparticules après injection intraveineuse chez le rat ( $t_{1/2}$  passe de 1 heure à 30 minutes).<sup>[90]</sup>

Bazile *et al.*<sup>[20;80]</sup> ont été les premiers à développer des nanoparticules, préparées par nanoprécipitation, à base de mPEG-PLA et de mélanges de PLA et de mPEG-PLA. Ces nanoparticules sont moins rapidement capturées par les monocytes THP-1 en comparaison avec les nanoparticules de première génération à base de PLA recouvertes avec le pluronic F68 (tensioactif). La demi-vie dans le sang des nanoparticules « PEGylées » a été multipliée par un facteur 180 par rapport aux particules non-recouvertes et recouvertes de F68. Cette capacité à éviter le MPS a été expliquée par une conformation où la densité du PEG à la surface des particules est un paramètre clé. Dans une autre étude,<sup>[91]</sup> ils ont exploré également l'effet du PEG sur l'activation du complément, qui est le facteur clé de la phagocytose des nanoparticules. Ils ont pu montrer qu'au bout de 5 min, il y a une importante consommation du complément en présence de nanoparticules à base de PLA/F68. Contrairement à ce résultat,

les nanoparticules de mPEG-PLA montrent une très faible consommation du complément, et qui est proportionnelle à la densité de mPEG à la surface des nanoparticules. Ces résultats ont été confirmés par Gref *et al.*<sup>[22]</sup> pour l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des nanoparticules à base de PLA et de mPEG-PLA. Avec une chaîne de PLA de 45 kDa, l'adsorption diminue en augmentant la longueur de chaîne de mPEG, et se stabilise pour des chaînes de plus de 5000 kDa. Lorsque le pourcentage de mPEG (5000 kDa) est réduit, en mélangeant le copolymère mPEG-PLA avec du PLA, la densité de surface en mPEG diminue et l'adsorption des protéines augmentent. La valeur minimale d'adsorption est atteinte avec des taux de mPEG situés entre 5% et 20% (w/w) (Figure 14).

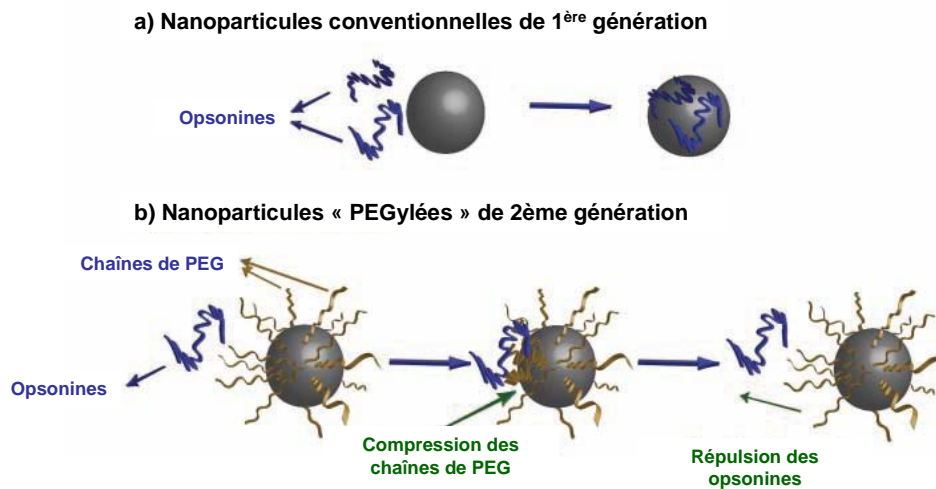


**Figure 14 : Quantités totales de protéines adsorbées à la surface des nanoparticules de mPEG-PLA, en fonction de la taille (A) et du pourcentage (B) de la chaîne de mPEG.**<sup>[22]</sup>

Des résultats similaires ont été décrits par Langer *et al.*<sup>[92]</sup> en 1994 avec des nanoparticules de mPEG-PLGA préparées en une seule étape par la méthode « émulsification/évaporation de solvant ». Les nanosphères étudiées montrent un temps de circulation dans le sang qui augmente avec la densité et la longueur de chaîne de mPEG. Les auteurs ont également étudié la biodistribution de ces nanoparticules. L'accumulation de ces dernières dans le foie de souris est considérablement réduite par rapport aux nanoparticules conventionnelles de première génération (sans PEG). De plus, les nanoparticules « PEGylées » permettent d'encapsuler environ 45% (w/w) de molécule active (lidocaïne) dans le cœur hydrophobe en une seule étape et peuvent être lyophilisées et redispersées dans des solutions aqueuses sans additifs.

Ces résultats expérimentaux confortent bien le modèle théorique proposé par Jeon *et al.*<sup>[93;94]</sup> Le modèle proposé se base sur un concept de répulsion stérique des protéines. Les auteurs ont mis l'accent sur l'importance de la densité de surface du PEG dans la répulsion stérique

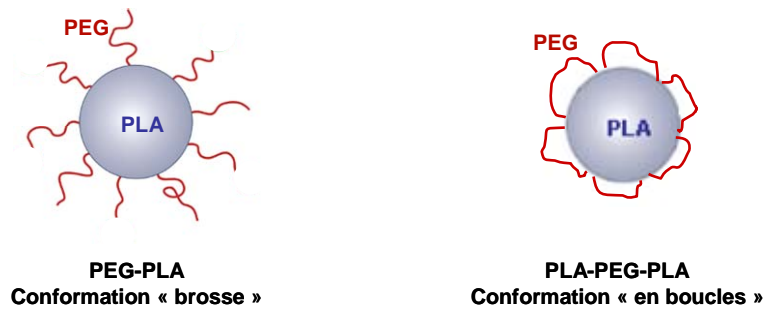
(Figure 15). Ils ont estimé à 15 Å la distance moyenne entre deux chaînes de PEG pour repousser efficacement les protéines (60 – 80 Å).



**Figure 15 : Représentation schématique montrant la répulsion stérique des opsonines par les nanoparticules « PEGylées ».**<sup>[10]</sup>

D'un autre côté, il a été démontré que les nanoparticules à base de mPEG-PLA sont capables d'éviter également les facteurs plasmatiques du système de coagulation (Thrombine, facteur V et ions de calcium), en comparaison avec les nanoparticules conventionnelles.<sup>[95]</sup> La densité de mPEG permet en effet d'éviter les interactions fortes avec les différentes protéines et la formation d'agrégats entre les particules.

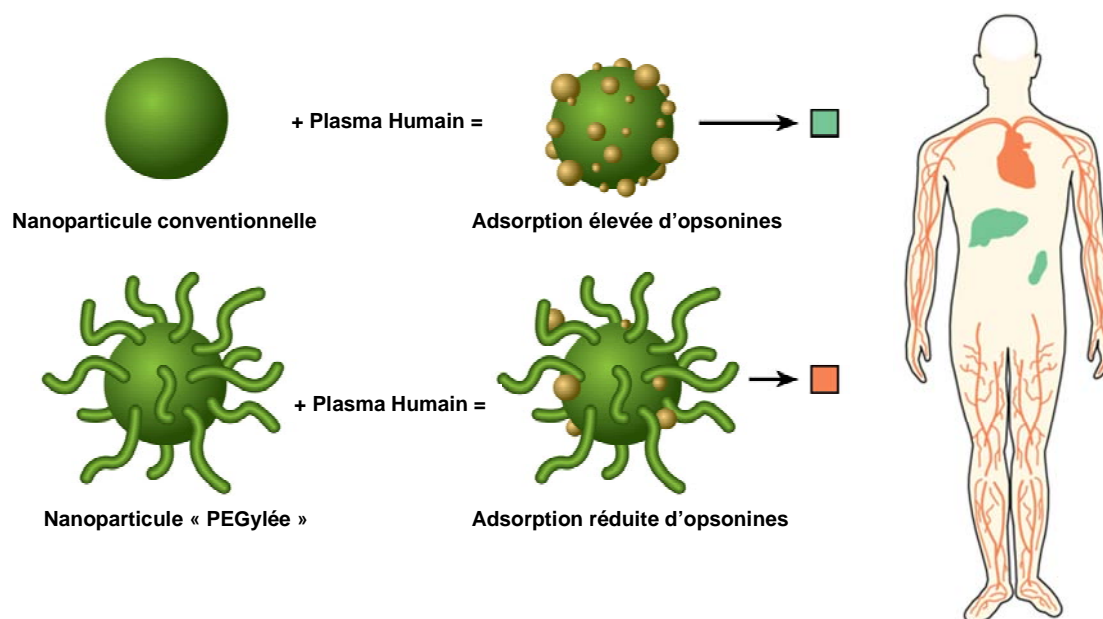
Tous ces di-blocs mPEG-PLA permettent d'obtenir des nanoparticules avec une conformation « brosse », où la couronne hydrophile est composée des chaînes de mPEG liées d'un côté au cœur hydrophobe de PLA et libres de l'autre côté. Une autre conformation peut être atteinte en utilisant des tri-blocs de PLA-PEG-PLA. Comme montré sur la Figure 16, les chaînes de PEG hydrophiles constituent la couronne, stabilisant ainsi les nanoparticules, et les chaînes de PLA constituent le cœur hydrophobe.<sup>[96;97]</sup> La configuration obtenue est appelée « en boucles ».



**Figure 16 : Représentation schématique de la configuration du PEG dans les nanosphères de mPEG-PLA (dibloc) et de PLA-PEG-PLA (tribloc).**

Selon Perracchia *et al.*,<sup>[21]</sup> les nanosphères à base de poly(cyanoacrylate d'isobutyl) (PIBCA) recouvertes par des chaînes de PEG « en boucles » augmentent la consommation du complément par rapport à leur homologues recouvertes de mPEG « en brosse », ce qui faciliterait leur capture par le MPS. Ces observations ont été ensuite confirmés sur des nanoparticules à base de PLA par Ma *et al.*.<sup>[97]</sup> Ils ont démontré qu'avec une configuration « brosse » (mPEG-PLA) une courte chaîne de mPEG (2000 g/mol) est suffisante pour réduire la capture des nanoparticules par des cellules phagocytaire, tandis qu'avec une configuration « boucles » (PLA-PEG-PLA), la taille de la chaîne de PEG doit être d'environ 8000 g/mol pour avoir un résultat comparable. Dans ce dernier cas, la configuration de surface du PEG est de plus en plus contrainte, de sorte que la flexibilité du PEG est supérieure dans le cas des diblocs. Ces observations illustrent clairement que la densité de surface du PEG n'est pas suffisante à elle seule pour réduire la capture. Les chaînes de PEG doivent être également libres et flexibles pour occuper plusieurs configurations spatiales (pour atteindre une entropie suffisante), afin d'éviter l'opsonisation et la capture par le MPS.

Les nanoparticules de deuxième génération, recouvertes de manière covalente avec des chaînes de PEG, permettent clairement de minimiser le phénomène d'opsonisation de manière à obtenir des temps de circulation *in vivo* prolongés. Ceci facilite donc l'accumulation des nanoparticules au niveau des tumeurs qui présentent des fenestrations au niveau de l'endothélium vasculaire et ce grâce à l'effet EPR. Il s'agit donc d'un ciblage passif des tissus tumoraux, contrairement au ciblage du MPS par les nanoparticules de 1<sup>ère</sup> génération (Figure 17).



**Figure 17 : Biodistribution des nanoparticules. (Vert) NPs de 1<sup>ère</sup> génération : adsorption d'opsonines, capture par le RES et accumulation dans le foie et la rate. (Orange) NPs de 2<sup>ème</sup> génération : faible d'adsorption d'opsonines, circulation prolongée dans le sang et ciblage passif des tumeurs.**

### *c. Vecteurs de 3<sup>ème</sup> génération - ciblage actif*

L'objectif primordial de la thérapie du cancer est l'élimination des cellules cancéreuses et le maintien de l'activité des cellules saines. Par conséquent, le défi des années à venir dans la vectorisation des principes actifs sera sans doute la préparation de vecteurs colloïdaux présentant des ligands à leur surface permettant un ciblage spécifique basé sur la reconnaissance cellulaire (Figure 13).

Dans le cas des nanoparticules à base de PEG-PLA, quelques exemples de fonctionnalisation de la surface ont été décrits avec différents ligands : acide folique, peptide, lectine, albumine, etc.<sup>[74;98-101]</sup> Ces nanoparticules fonctionnalisées peuvent cibler activement des organes spécifiques, et augmenter donc l'efficacité thérapeutique de la molécule active et diminuer sa toxicité.

L'acide folique a été largement utilisé pour la fonctionnalisation de nanoparticules destinées au traitement du cancer à cause de la surexpression des récepteurs foliques à la surface des cellules cancéreuses. Les nanoparticules de PEG-PLA fonctionnalisées à l'acide folique comme ligand (Folate-PEG-PLA, Figure 18) peuvent ainsi s'accumuler et augmenter la concentration du principe actif au niveau des tumeurs cancéreuses. Il a été démontré par Tsai *et al.*<sup>[102]</sup> que la capture cellulaire des nanoparticules fonctionnalisées à l'acide folique est

supérieure à celle des nanoparticules non-fonctionnalisées. L'étude *in vivo* montre un ciblage actif de la tumeur cancéreuse et une inhibition efficace de la croissance de la tumeur.

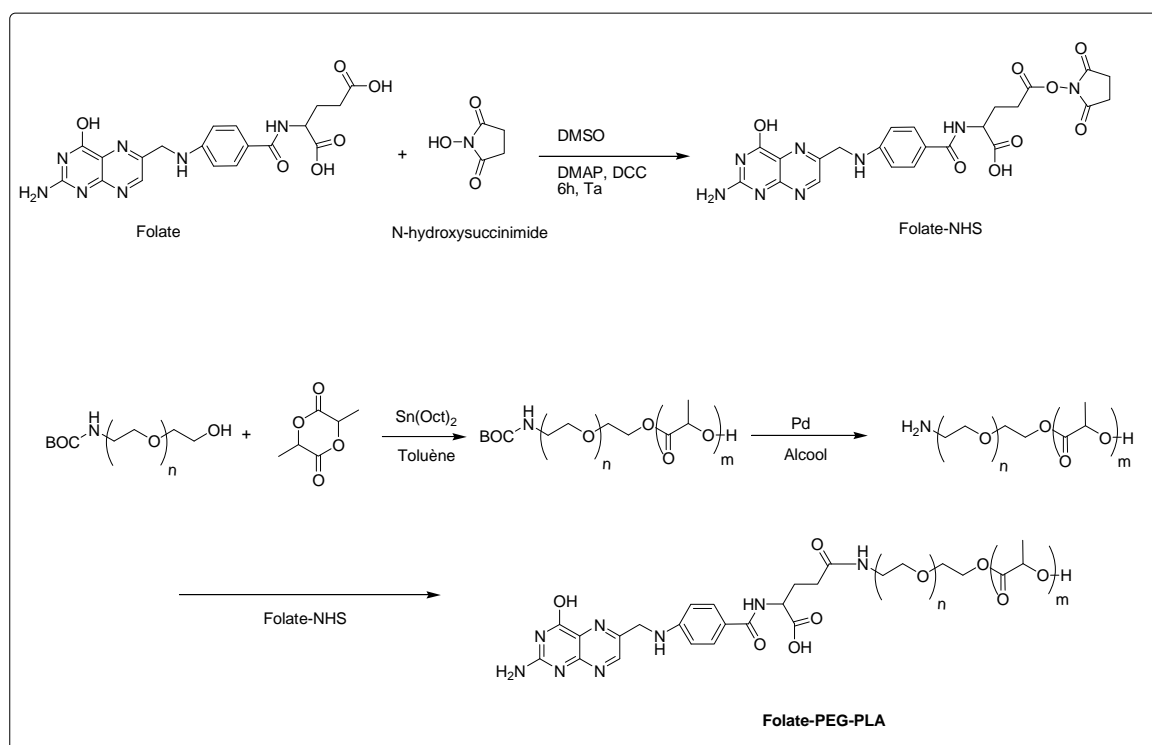


Figure 18 : Schéma de synthèse du conjugué fonctionnalisé Folate-PEG-PLA.<sup>[102]</sup>

Un autre type de nanoparticules de PEG-PLA fonctionnalisées avec des carbohydrates ont été développées par Kataoka *et al.*, pour évaluer leur affinité de fixation au récepteur cellulaire, *ricinus communis* lectine *in vitro*.<sup>[103-106]</sup> Le carbohydrate de lactose a été utilisé pour produire les nanoparticules fonctionnalisées à base de PEG-PLA.<sup>[105;106]</sup> Ces dernières ont montré plusieurs avantages par rapport aux nanoparticules non-fonctionnalisées. A titre d'exemple, les nanoparticules avec un taux de fonctionnalisation de 80 % se lient aux récepteurs de manière trivalente [3 lactoses à la surface de la même nanoparticule se lient à 3 récepteurs (lectines)] avec une forte constante d'association. En revanche, les nanoparticules avec un taux de fonctionnalisation de 20 % présentent un modèle de liaison bivalent (2 lactoses à la surface de la même nanoparticule se lient à 2 lectines). Le modèle trivalent améliore de manière très significative l'association entre les ligands et les récepteurs, en comparaison avec le modèle bivalent. Cette amélioration est liée à une augmentation importante de la constante d'équilibre d'association entre le ligand et le récepteur (de  $7.4 \times 10^{-4} \text{ nM}^{-1}$  à  $0.25 \text{ nM}^{-1}$  pour 20% et 80% de fonctionnalisation, respectivement). Ce phénomène de multivalence permet aux nanoparticules de rester attachées plus longtemps aux cellules cibles via des récepteurs spécifiques.

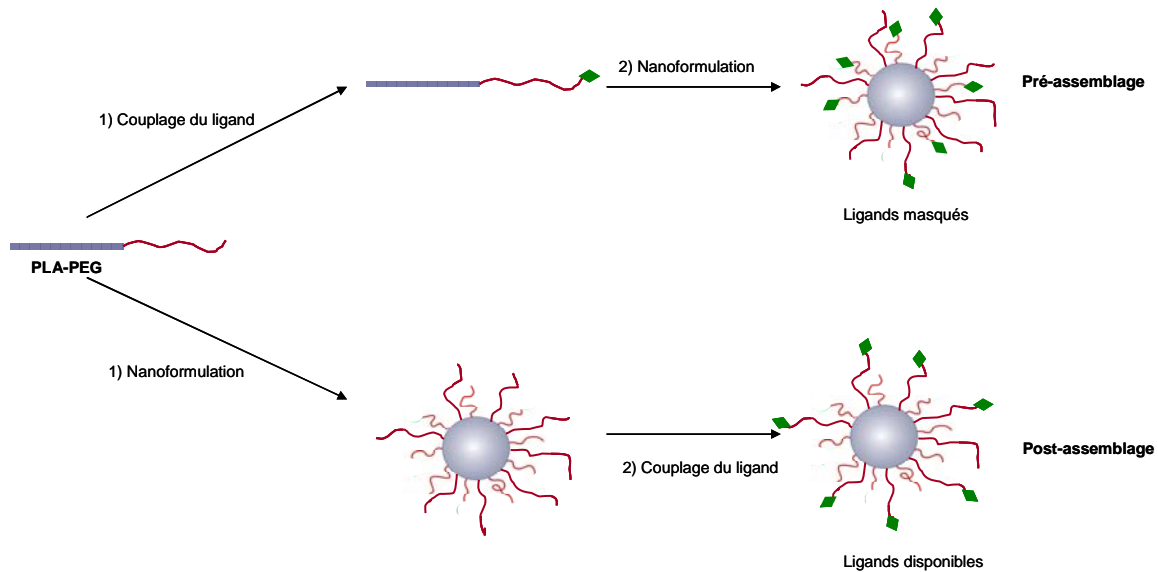
Les peptides ont été également utilisés pour la fonctionnalisation de nanoparticules afin de cibler certains récepteurs spécifiques. Dans ce cadre, Yu *et al.*<sup>[107]</sup> ont préparé des nanoparticules de PEG-PLA fonctionnalisées par le peptide K237. Ces nanoparticules, encapsulant le paclitaxel, peuvent être internalisées significativement par les cellules endothéliales via une reconnaissance spécifique K237-KDR (KDR : récepteur vasculaire endothélial du facteur de croissance). Ceci facilite l'internalisation du paclitaxel, ce qui conduit à une forte activité anticancéreuse en comparaison avec le taxol commercial et les nanoparticules de seconde génération (paclitaxel/PEG-PLA).

Les aptamères (des oligonucléotides synthétiques) ont été aussi utilisés pour cibler certaines tumeurs. Farokhzad *et al.*<sup>[101;108]</sup> ont développé des nanoparticules de PEG-PLA fonctionnalisées avec un ARN-aptamère pour cibler le cancer de prostate. Ces nanoparticules augmentent la capacité de fixation des nanovecteurs aux cellules cancéreuses, qui surexpriment l'antigène spécifique à l'aptamère. Lorsque le docétaxel est encapsulé au sein de ces nanoparticules, les auteurs démontrent une forte activité anticancéreuse en comparaison avec les nanoparticules de contrôle (non-fonctionnalisées).

D'autres types de fonctionnalisation des nanoparticules de PEG-PLA, avec des peptides, acides aminés et protéines, peuvent permettre aussi de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) très étanche, et donc cibler efficacement certaines maladies du système nerveux central.<sup>[109-111]</sup>

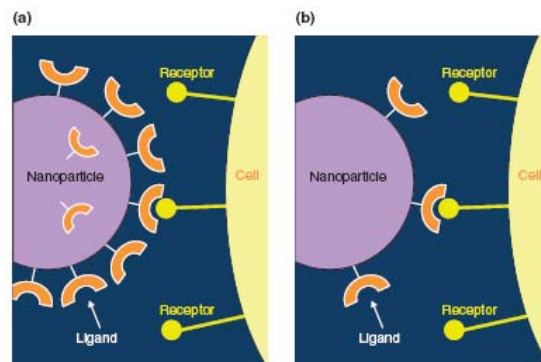
Dans certains cas, les nanoparticules fonctionnalisées peuvent présenter un effet négatif vis-à-vis de la « furtivité » des nanoparticules et de la fixation du ligand à la surface des cellules cibles. En effet, la couronne hydrophile du PEG peut par encombrement stérique empêcher les ligands de reconnaître l'antigène correspondant.<sup>[112]</sup> Inversement, une trop forte densité d'anticorps en surface des nanoparticules peut recréer un environnement hydrophobe, favorable à l'opsonisation et à l'activation du complément. Il apparaît donc nécessaire d'optimiser la présentation du ligand à la surface des nanoparticules tout en gardant leur caractère furtif. Parmi les stratégies développées, il y a le choix de la méthode de fonctionnalisation d'un ligand donné. A titre d'exemple, le ligand cRGD (peptide) a été attaché aux nanoparticules de PEG-PLA selon deux stratégies différentes. La première consiste à coupler le ligand au copolymère PEG-PLA, ensuite former les nanoparticules (pré-assemblage). La seconde consiste à coupler le ligand à la surface des nanoparticules de PEG-PLA préformées (post-assemblage). Il a été démontré que la capture cellulaire est beaucoup

plus efficace dans le cas du post-assemblage. Ceci suggère que le post-assemblage améliore la disponibilité du ligand (Figure 19).<sup>[112]</sup>



**Figure 19 : Représentation schématique de la disponibilité du ligand selon son mode de couplage : pré-assemblage et post-assemblage.**

De plus, dans plusieurs exemples, augmenter la densité du ligand à la surface des nanoparticules n'améliore pas forcément leur efficacité. En effet, des contraintes stériques peuvent empêcher la formation des liaisons Ligand-Récepteur multiples et simultanées (Figure 20).<sup>[23]</sup> Le facteur limitant est en effet la distance entre les récepteurs présents à la surface des cellules.



**Figure 20 : L'espace entre les récepteurs, et non pas la densité du ligand, est le facteur limitant du ciblage actif. (a) haute densité en ligands à la surface de la nanoparticule : formation d'une seule liaison ligand-récepteur à cause de la distance entre les récepteurs cellulaires. (b) une nanoparticule avec une plus faible densité en ligands est suffisante pour former également une liaison avec la cellule.**



### III. Nanoparticules à base de PEG-PLA pour l'administration de Taxanes

#### 1. Introduction sur les Taxanes

Les essais biologiques de plusieurs fractions d'extraits de plantes ont permis de découvrir plusieurs molécules biologiquement actives contre le cancer. Malheureusement, très peu de molécules sont apparues intéressantes d'un point de vue pharmacologique et susceptibles d'atteindre le stade d'essais cliniques.

Parmi ces molécules, le paclitaxel (Figure 21) (nom commercial : Taxol<sup>®</sup>), isolé à partir de l'arbre d'if de l'ouest (*Taxus brevifolia*, division des conifères) en 1969, avec un rendement d'environ 0.02%, est l'un des anticancéreux les plus efficaces contre le cancer du sein, de l'ovaire, du colon et de certains cancers du poumon.<sup>[113]</sup>

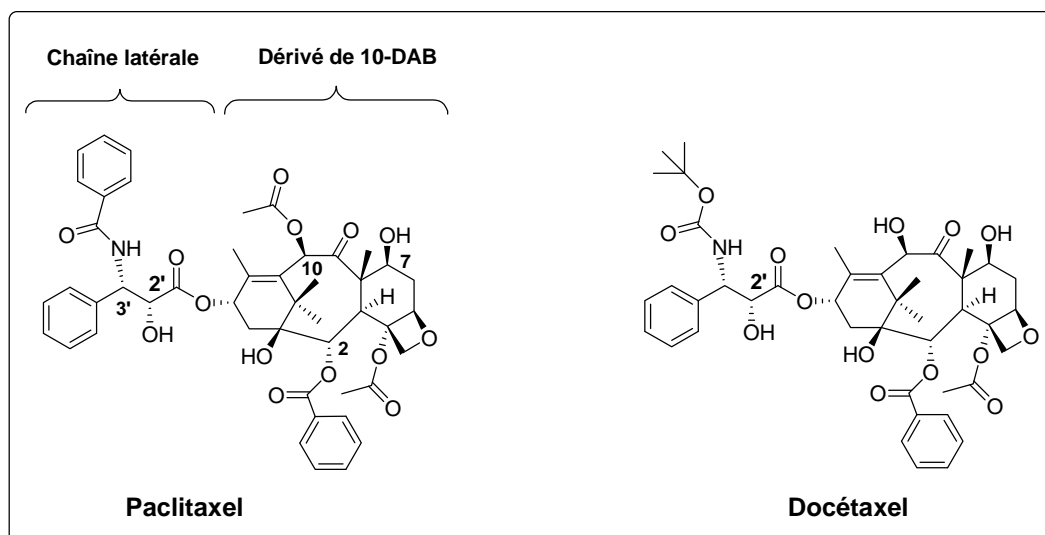
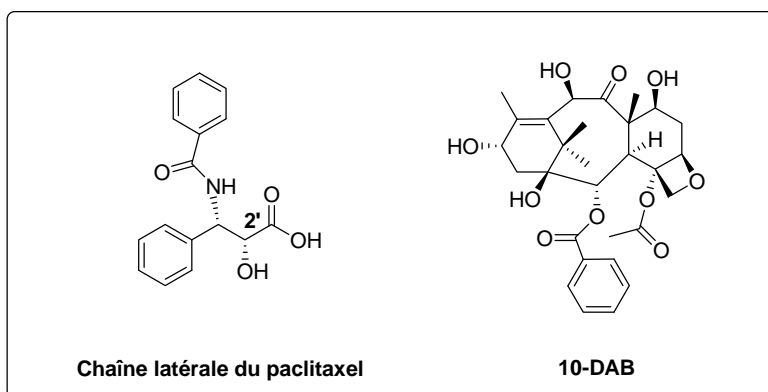


Figure 21 : Structures chimiques du Paclitaxel et du Docétaxel.

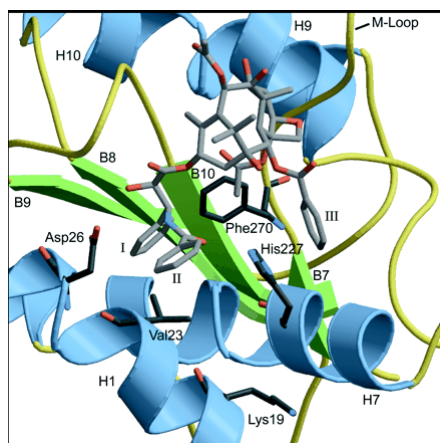
La structure chimique du paclitaxel peut être divisée en deux moitiés. La première moitié est un dérivé de 10-deacétylbaccatine III (10-DAB), un diterpénoïde (4 unités isoprène) comprenant un complexe tétracyclique. La 10-DAB est une substance naturelle qui peut être isolée à partir des feuilles d'if. La deuxième moitié (ou chaîne latérale) est un dérivé de (2R,3S)-2-Hydroxy-3-N-benzoylamino-3-phénylméthyl propionate, contenant une amine secondaire et un groupement hydroxyle secondaire en position 2' (Figure 22).



**Figure 22 : Structures chimiques des dérivés composant le paclitaxel.**

Vu le faible rendement d'extraction du produit naturel, les chercheurs se sont penchés sur la synthèse chimique du paclitaxel, ainsi que d'autres dérivés de taxanes (ex. Docétaxel, Figure 21, nom commercial : Taxotère®). Une des approches les plus prometteuses a été développée par Potier *et al.* Il s'agit d'une synthèse partielle du paclitaxel, à partir de 10-deacétylbaccatine III (10-DAB).<sup>[114]</sup> Le docétaxel s'est avéré deux fois plus actif que le paclitaxel. Il a été démontré également que les fonctions phényle en positions C-2, C-3' et C-3'-N ne sont pas essentielles à l'activité antimittotique et à la cytotoxicité du paclitaxel. Ces groupements ont donc été remplacés par d'autres substituants, tels que les substituants cyclohexyle ou alkyle, pour le développement d'une 2<sup>ème</sup> génération de taxanes.<sup>[115]</sup>

Les taxanes agissent en se liant à la tubuline, via leur hydroxyle en position 2', au niveau du groupement NH<sub>2</sub> terminal de la sous-unité  $\beta$ -tubuline (Figure 23). Cette liaison favorise l'assemblage de la tubuline en microtubules, tout en inhibant leur dépolymérisation. Ceci conduit à la stabilisation des microtubules, ce qui entraîne l'inhibition de la mitose et l'interphase des fonctions cellulaires.<sup>[116]</sup>



**Figure 23 : Modélisation de l'interaction du taxol avec l'unité  $\beta$ -tubuline.**

Vu le caractère très hydrophobe du paclitaxel, et afin d'atteindre une efficacité acceptable, il a été formulé avec un mélange de Cremophor EL (ou le polyoxyéthylénate d'huile de ricin, un tensioactif non-ionique) et d'éthanol (1/1). Mais, cette formulation présente plusieurs effets secondaires : hypersensitivité, néphrotoxicité et neurotoxicité.<sup>[117;118]</sup> D'où la nécessité de développer des formulations alternatives moins toxiques, et qui permettrait d'améliorer son efficacité. Parmi les stratégies identifiées, nous pouvons citer : (i) la modification structurale du principe actif, (ii) l'amélioration de sa solubilité dans l'eau (ex. émulsification), (iii) la complexation du principe actif (ex. Paclitaxel-cyclodextrine) et (iv) l'utilisation de vecteurs encapsulant le principe actif (ex. liposomes, nanoparticules).<sup>[118]</sup>

L'utilisation de vecteurs polymériques biodégradables a été largement étudiée ces dernières années, et a montré une nette amélioration de l'efficacité du traitement chimiothérapique et une réduction de la toxicité associée. Parmi ces polymères biodégradables et biocompatibles, nous nous focaliserons sur les copolymères de PEG-PLA, précédemment décrits comme de très bons candidats pour l'administration d'agents thérapeutiques.

## ***2. Encapsulation physique et libération de Taxanes***

L'encapsulation physique des taxanes au sein des nanoparticules de PEG-PLA est basée essentiellement sur les interactions hydrophobes entre le principe actif et la chaîne de PLA. Le principe actif se localise préférentiellement dans le cœur hydrophobe des nanoparticules. La simulation de la distribution du paclitaxel dans des nanoparticules de PEG-PLA montre qu'elle est homogène dans tout le cœur hydrophobe, entouré par les chaînes hydrophiles de PEG.<sup>[119]</sup>

Les nanoparticules à base de PEG-PLA ont commencé à être utilisées pour la délivrance d'anticancéreux il y a à peine une dizaine d'années. La méthode et les paramètres expérimentaux (solvant organique, rapport phase organique/phase aqueuse, température...) employés pour la préparation de nanoparticules influencent considérablement les propriétés physico-chimiques des formulations. A titre d'exemple, Danhier *et al.*<sup>[120]</sup> ont décrit une meilleure efficacité d'encapsulation du paclitaxel, au sein des nanoparticules à base de mPEG-PLGA, avec la méthode de nanoprécipitation (70%), en comparaison avec la technique d'émulsification/évaporation de solvant (40%). Il a été démontré également que l'augmentation du rapport phase organique/phase aqueuse<sup>[121]</sup> et de la concentration du polymère dans la phase organique<sup>[122;123]</sup> permet d'améliorer l'efficacité d'encapsulation du

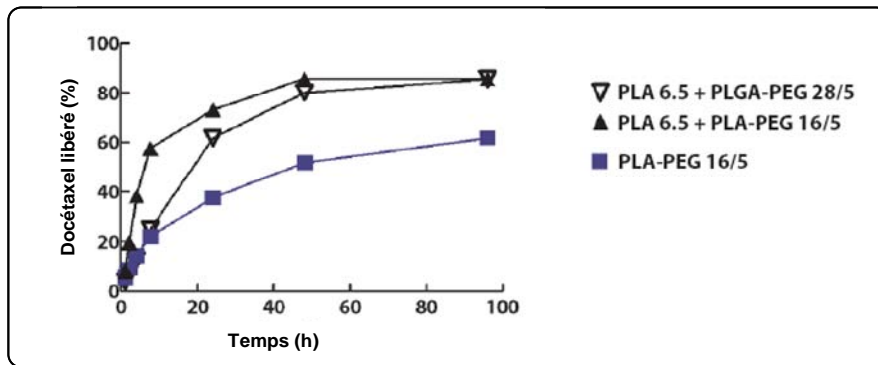
paclitaxel en utilisant la technique de nanopréciipitation. La nature de la phase organique peut aussi influencer la taille des nanoparticules ainsi que l'efficacité d'encapsulation du principe actif.<sup>[124]</sup> la taille des nanoparticules semble aussi influencer l'efficacité d'encapsulation ainsi que la libération du paclitaxel. Les nanoparticules de plus petites tailles ont une plus faible efficacité d'encapsulation, accompagnée d'une libération *in vitro* plus rapide à cause de chemins de diffusion plus courts et de plus importantes surfaces.<sup>[123;125]</sup> Le processus de libération du principe actif, dans le cas des nanosphères de PEG-PLA, est contrôlé par la diffusion du principe actif et la dégradation de la matrice polymérique.<sup>[126]</sup>

Le profil de libération dépend également de la méthode de préparation des nanoparticules. Yang *et al.*<sup>[127]</sup> ont démontré que la libération du paclitaxel est plus rapide dans le cas d'une préparation par simple dissolution du copolymère mPEG-PLA et du paclitaxel dans la phase aqueuse, en comparaison avec la technique de dialyse. Avec cette dernière technique, le copolymère et le paclitaxel sont dissouts dans un solvant miscible à l'eau (ex. le N-méthyl-2-pyrrolidone). La solution est ensuite placée dans une membrane de dialyse (MWCO ~ 3500 g/mol) et dialysée pendant 24 heures contre un grand volume d'eau distillée, renouvelée régulièrement. La différence de vitesse de libération du PA est expliquée par le fait que le processus d'osmose dans la technique de dialyse permet d'obtenir des nanoparticules avec un cœur solide très compact, ce qui défavorise la diffusion du principe actif. Tandis que dans le cas d'une dissolution directe, les micelles obtenues ont un cœur hydrophobe plus fluide. Il en résulte donc une diffusion plus facile et plus rapide du PA.

La capacité d'encapsulation physique de taxanes dépend en effet de plusieurs paramètres. La méthode de préparation des nanoparticules et les conditions expérimentales sont des paramètres clés dans cette encapsulation. Dans une récente étude de Langer *et al.*,<sup>[74]</sup> les auteurs ont préparé une librairie de plus de 100 nanoparticules [à base de PEG-PLA (et PLGA), de docétaxel et d'un ligand spécifique pour le cancer de prostate] en variant la composition des formulations et le procédé de préparation. A titre d'exemple, le taux de charge en docétaxel au sein des nanoparticules préparées par la méthode d'émulsification est compris entre 3% et 14% (w/w) (pour un taux théorique visé de 20%, l'efficacité d'encapsulation est donc comprise entre 15% et 70%). Ce taux de charge dépend de la formulation et des paramètres du procédé (solvants utilisés, temps, agitation, température...). Le meilleur taux de charge est obtenu en utilisant comme phase organique un mélange d'acétate d'éthyle et d'alcool benzylique avec des ratios compris entre 90/10 et 70/30 (w/w).

En revanche, le taux de charge en docétaxel ne dépasse pas 1% dans les nanoparticules préparées par nanopréciipitation. Cette différence peut être expliquée par le fait que dans le cas du procédé d'émulsification, le principe actif est préalablement bien piégé dans les gouttelettes organiques sphériques (contenant aussi la partie hydrophobe du copolymère) lors de l'émulsification et de l'homogénéisation de ces gouttelettes. Tandis que dans le cas de la nanopréciipitation, le principe actif est encapsulé grâce aux interactions hydrophobes avec le PLA au moment de la précipitation de ce dernier sous forme de nanosphères.

La libération du docétaxel *in vitro* a été ensuite étudiée dans le PBS en utilisant la méthode de dialyse. La cinétique de cette libération dépend clairement de la composition et des propriétés physicochimiques des nanoparticules. A titre d'exemple, une libération de 50 % est atteinte en 6 h, 19 h et 45 h pour les compositions respectives PLA<sub>6500</sub>/PLGA<sub>28000</sub>-PEG<sub>5000</sub> (1/1), PLA<sub>6500</sub>/PLA<sub>16000</sub>-PEG<sub>5000</sub> (1/1) et PLA<sub>16000</sub>-PEG<sub>5000</sub> (Figure 24). Cette étude illustre bien la possibilité d'améliorer le profil de libération du principe actif en variant la composition des nanoparticules, particulièrement celle de la partie hydrophobe qui encapsule le PA.



**Figure 24 : Libération *in vitro* du docétaxel (PBS pH 7.4, 37 °C) à partir des nanoparticules à base de PEG-PLA/PLGA, préparées par « émulsification ».**<sup>[74]</sup>

D'un autre côté, Yang *et al.*<sup>[127]</sup> ont démontré également que l'utilisation d'un dibloc mPEG-PLA ou un tribloc PLA-PEG-PLA influence la capacité d'encapsulation des nanoparticules. En effet, les nanoparticules à base d'un dibloc permettent une plus faible efficacité d'encapsulation et une libération initiale plus rapide du paclitaxel (« burst release » plus important), et ce à cause de la mobilité des chaînes de PEG à la surface des nanoparticules. Alors que dans le cas du tribloc, le paclitaxel se retrouve mieux piégé grâce aux contraintes exercées par les boucles de PEG à la surface des nanoparticules.

L'influence de la stéréocomplexation de *D*-PLA et *L*-PLA a été également explorée.<sup>[127]</sup> L'utilisation d'un mélange de *D*-PLA-PEG et *L*-PLA-PEG permet d'obtenir des

nanoparticules plus stables, avec une plus faible valeur de CMC, en comparaison avec les nanoparticules à base d'énantiomères séparés. Par conséquent, la capacité d'incorporation du principe actif peut être considérablement améliorée grâce à cet effet de stéréocomplexation. En raison de la forte interaction entre *D*-PLA et *L*-PLA, le cœur hydrophobe des nanoparticules devient plus compact, et la libération du paclitaxel plus lente. La libération plus rapide dans le cas des nanoparticules à base d'énantiomères séparés (*D*-PLA ou *L*-PLA) peut être liée aussi à leur plus faible capacité d'encapsulation.

De manière générale, l'efficacité d'encapsulation physique des taxanes au sein des nanoparticules de PEG-PLA est inférieure à 50% (elle atteint dans certains cas 70%),<sup>[74;127]</sup> ce qui traduit une perte considérable des molécules non encapsulées. De la même manière, le taux de charge en taxanes est généralement faible, surtout dans le cas de la nanoprécipitation [ne dépassant pas 5% (w/w)] et mal contrôlée et la libération du principe actif montre une libération initiale très rapide (« Burst release »), dépassant dans certains cas les 50%.<sup>[32;127;128]</sup> Cette première phase est ensuite suivie par une phase de libération soutenue. Par ailleurs, l'étude de Langer *et al.* montre bien que le phénomène de « Burst » peut être limité en préparant les nanoparticules par « émulsification » et en variant la composition du cœur hydrophobe (Figure 24).<sup>[74]</sup>

### ***3. Encapsulation covalente et libération de Taxanes***

En plus de la variation de la composition des nanoparticules et de leurs conditions de préparation, le couplage covalent du principe actif hydrophobe au cœur des nanoparticules semble être une stratégie intéressante pour augmenter et maîtriser le taux d'encapsulation et contrôler la libération du principe actif en fonction de la nature du lien entre le PA et le polymère, tout en utilisant une méthode simple de formulation (nanoprécipitation). Tous ces avantages nous ont incités à explorer cette stratégie d'encapsulation de taxanes au sein de nanoparticules de PEG-PLA et à étudier son influence sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, sur le profil de libération du PA et sur leur comportement *in vivo*.

La conception de l'espaceur, qui forme le lien entre le principe actif (PA) et les macromolécules, a souvent un effet considérable sur la libération du PA dans des environnements particuliers. Dans une revue sur les technologies de couplage, Soyez *et al.* (1996) mettent l'accent sur plusieurs facteurs clefs à considérer pour la conception de conjugués performants (appelés également prodrogues).<sup>[129]</sup> Dans un premier temps, nous

détaillerons la nature et les propriétés d'hydrolyse de principaux espaceurs décrits dans la littérature.

*a. Etat de l'art sur les espaceurs*

Indépendamment de la demi-vie de circulation ( $t_{1/2}$ ) des polymères conjugués, la vitesse de dissociation de l'espaceur devient aussi importante que la masse moléculaire du polymère. Une libération trop rapide du principe actif peut mener à une possible toxicité, tandis qu'une vitesse de libération trop lente mettra en péril l'efficacité du PA. Ainsi, la stabilité du conjugué et son potentiel pour la dégradation contrôlée ont un rôle important dans la détermination de l'efficacité du principe actif. Si le conjugué est destiné à atteindre une cible extracellulaire ou intracellulaire particulière, le lien doit être suffisamment stable jusqu'à ce que la cible soit atteinte. Au site cible, le PA devra être libéré par un mécanisme spécifique, enzymatique. La présence d'espaceur devrait fournir l'espacement suffisant entre le PA et le polymère, permettant ainsi l'accès d'enzymes et donc la libération du PA.

La grande majorité des espaceurs est sensible à l'hydrolyse chimique ou enzymatique. Il faut ainsi considérer les propriétés du milieu d'hydrolyse, en particulier le pH et les enzymes présents dans les cellules et les tissus cibles.

*(i.) Méthode de libération du PA*

Le PA, lié au vecteur via un espaceur, peut être libéré durant la circulation sanguine ou après capture cellulaire. La conséquence principale de cette liaison covalente est la limitation du mécanisme d'endocytose due à la capture cellulaire du PA.<sup>[129]</sup> Contrairement aux petites molécules, qui peuvent être internalisées par les cellules passivement ou activement à travers la membrane cellulaire, les conjugués macromoléculaires doivent passer par une étape de pinocytose (Figure 25). La pinocytose est un type d'endocytose non spécifique : dans la pinocytose, la cellule absorbe les conjugués, et les redirige vers les lysosomes sous forme de minuscules vésicules en vue de leur assimilation. La pinocytose ne constitue pas une forme de transport spécifique. Cette capture pinocytaire est suivie par un transfert dans le compartiment endosomal de la cellule. Les macromolécules sont ensuite dirigées, via plusieurs fusions vésiculaires, dans un compartiment lysosomal assurant une exposition continue à un environnement acide. Les différents enzymes contenus dans les lysosomes vont ensuite permettre l'hydrolyse de l'espaceur et la libération du principe actif. Ce dernier passe ensuite dans le cytoplasme pour pouvoir agir sur sa cible.

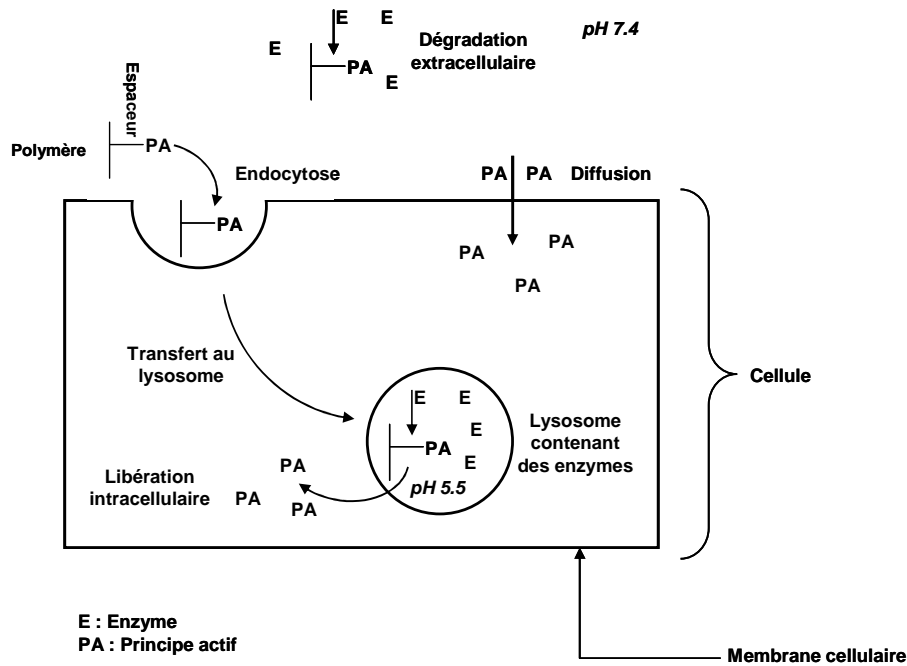


Figure 25 : Principe de la vectorisation lysosomotropique.

Idéalement, le vecteur doit être suffisamment stable et pharmacologiquement inactif durant la circulation sanguine, ensuite il doit permettre la libération du principe actif au niveau du tissu tumoral (dans le milieu extracellulaire ou intracellulaire) (Figure 25). Cette libération *in vivo* peut se faire par hydrolyse non-spécifique ou par clivage plus spécifique : enzymatique, réductif ou pH-dépendant.

#### - Hydrolyse non-spécifique

Les fonctions esters, carbonates, amides et uréthanes sont sensibles à l'hydrolyse passive qui se fait dans un milieu aqueux. La vitesse d'hydrolyse diminue dans l'ordre *ester* > *carbonate* > *uréthane* > *amide*.<sup>[129]</sup> Le clivage pourrait se faire au niveau de la liaison polymère-espaceur, pour libérer l'entité espaceur-PA, ou au niveau de la liaison espaceur-PA pour libérer directement le PA (Figure 26).

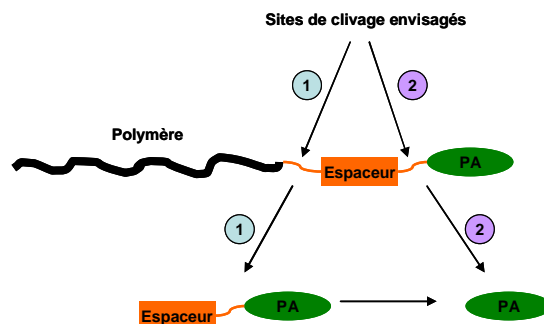


Figure 26 : Sites de clivage envisagés pour une prodrogue.



Dans notre cas, l'hydrolyse des fonctions esters est d'une importance cruciale, puisque le nanovecteur utilisé est composé d'une chaîne de polyester (PLA). Comme nous l'avons mentionné précédemment, le PLA se dégrade par hydrolyse passive et enzymatique des fonctions esters. La dégradation du PLA génère des oligomères et de l'acide lactique qui est introduit par la suite dans le cycle de Krebs. Cette hydrolyse passive du PLA pourrait donc influencer la vitesse de libération du principe actif (dans une matrice polymérique dégradée, le PA devient plus accessible à l'hydrolyse et diffuse à travers le cœur de PLA plus rapidement).

- *Hydrolyse enzymatique*

L'activation d'une prodrogue (libération du principe actif) peut se faire à l'aide d'enzymes associées à certaines tumeurs, telles que les protéases, la glucuronidase et les carboxylestérases. Le choix de l'espaceur dépend de la nature de la tumeur et donc des enzymes surexprimées à ce niveau. A titre d'exemple, l'espaceur peptidique « Phe-Ala-Ala-Phe(NO<sub>2</sub>)-Phe-Val-Leu-OM4P » semble être un bon substrat pour la cathepsine D, qui est surexprimée au niveau extracellulaire des tumeurs.<sup>[130]</sup>

Dans une autre étude brevetée par Trouet *et al.*, les auteurs revendiquent des conjugués d'anticancéreux (ex. la doxorubicine) couplés à des séquences peptidiques : L-Alanyl, L-Leucyl et L-Phenylalanyl.<sup>[131]</sup> Dans ce cas, l'hydrolyse de la liaison espaceur-PA se fait grâce aux peptidases spécifiques et/ou non spécifiques.

Il est également possible de coupler une enzyme à un anticorps spécifique à un récepteur présent dans une tumeur donnée. Après injection dans le sang, l'anticorps se lie de manière sélective à la surface des cellules tumorales comportant l'antigène correspondant. Une fois la discrimination du taux enzymatique entre les cellules normales et les cellules tumorales est suffisante (accumulation significativement supérieure au niveau du tissu tumoral), la prodrogue inactive est administrée dans le sang, et devient active en réagissant avec l'enzyme, préférentiellement au niveau de la tumeur. Cette technologie est connue sous le nom de « Antibody-directed enzyme prodrug therapy » (ADEPT) (Figure 27).<sup>[132]</sup>

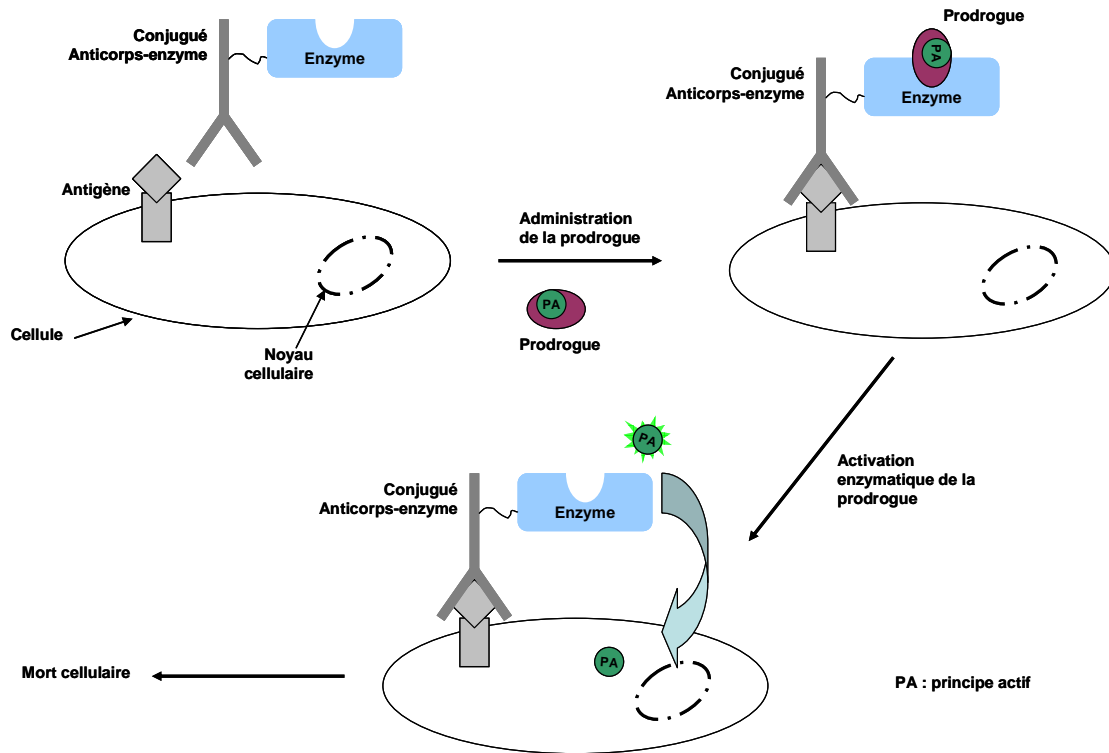


Figure 27 : Présentation schématique de la stratégie ADEPT.

Une récente extension du ciblage passif, décrit dans le chapitre I, a été inspirée de cette dernière technologie : « Polymer-directed enzyme prodrug therapy » (PDEPT).<sup>[133]</sup> Cette stratégie consiste à remplacer l'anticorps par un polymère. Dans ce dernier cas, les conjugués utilisés s'accumulent au niveau de la tumeur uniquement par effet EPR sans reconnaissance spécifique.

#### - Hydrolyse pH-dépendante

Les conditions acides dans le tissu tumoral, dans les endosomes et les lysosomes (pH compris entre 4 et 6.5) peuvent être responsables du clivage des prodrogues pH-sensibles. Cette différence de pH avec le sang et le tissu sain (pH 7.2-7.4) peut être exploitée pour concevoir des conjugués en couplant le principe actif via des liaisons pH-dépendantes (espaces stables à pH neutre et sensibles à l'hydrolyse à pH acide) (Figure 28).

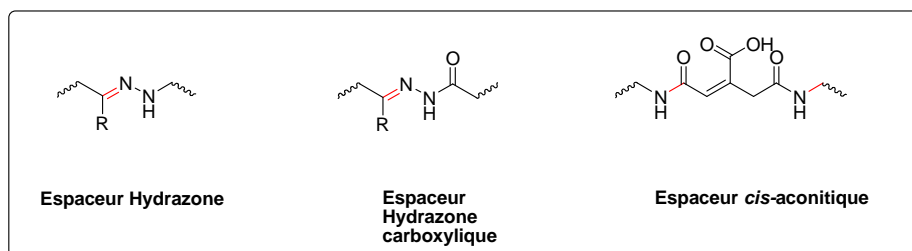


Figure 28 : Exemples d'espaceurs pH-dépendants (les liaisons clivables sont dessinées en rouge).<sup>[134]</sup>

Shen et Ryser sont les premiers à avoir décrit la synthèse de conjugués polymériques (poly-D-lysine) contenant des espaceurs pH-dépendants. La daunomycine est couplée au vecteur via des espaceurs de type N-cis-aconitique et N-maléique (Figure 29).<sup>[135]</sup> Le dérivé de N-cis-aconitique a une demi-vie de 3 h à pH 4, mais est beaucoup plus stable à pH 6 avec une demi-vie de 96 h. A pH 4, il y a une assistance intramoléculaire par liaison hydrogène, ce qui facilite l'hydrolyse et la libération du principe actif. Cette liaison hydrogène est absente lorsque le groupement -COOH est déprotoné à pH 6, inhibant ainsi l'hydrolyse.

Des études *in vitro* ont montré que le conjugué est capable d'être internalisé dans les cellules par pinocytose et de libérer le PA une fois le compartiment lysosomal atteint.

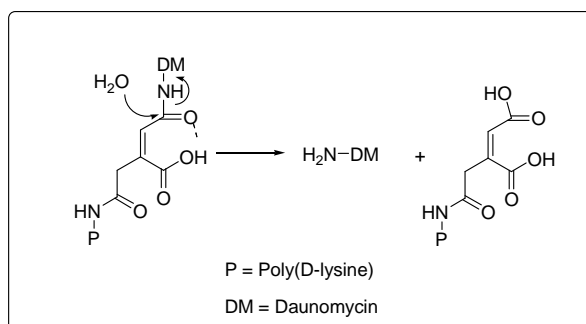


Figure 29 : Mécanisme de libération utilisant l'espaceur N-cis-aconitique.

La conception de telles prodrogues avec un espaceur pH-dépendant est loin d'être trivial. En plus de la nature chimique de l'espaceur, la stabilité de la prodrogue est également affectée par la nature et la masse moléculaire du vecteur et par la position de couplage sur le vecteur.<sup>[136]</sup>

#### - Espaceur sensible à la réduction

Certains tissus tumoraux se caractérisent par un environnement hypoxique (taux d'oxygène insuffisant). Cet environnement semble être adéquat pour la conception de prodrogues contenant des espaceurs sensibles à un milieu hypoxique (réducteur). L'activation de ces

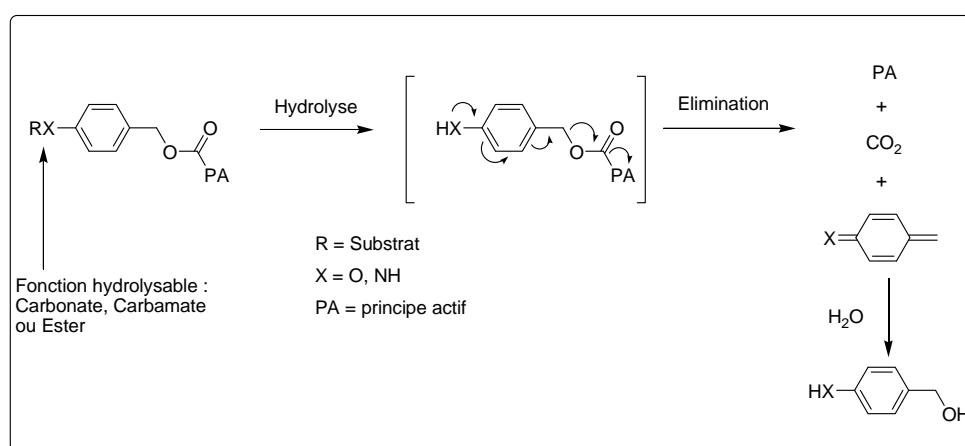
prodrogues peut se faire également à l'aide de certaines enzymes de réduction surexprimées au niveau des tumeurs. Ces enzymes constituent des systèmes de réduction à un ou deux électrons, telles que la Cytochrome c (P450) réductase et la DT-diaphorase.<sup>[137]</sup>

Shen et Ryser ont couplé le méthotrexate via un pont disulfure contenant un espaceur avec une macromolécule de poly(D-lysine).<sup>[138]</sup> Ils ont démontré que le conjugué est capable d'entrer au sein des cellules méthotrexate résistante par endocytose non-spécifique. Le principe actif est ensuite libéré à l'intérieur de la cellule par clivage de l'espaceur. Le mécanisme de clivage n'a pas été identifié, mais il semble qu'il ne fait pas intervenir l'enzyme de réduction « Glutathion », qui intervient classiquement dans la réduction des ponts disulfure présents au niveau des protéines.<sup>[138]</sup>

#### - Espaceurs auto-éliminés

Il existe des espaceurs auto-éliminés après hydrolyse enzymatique (protéases...) ou passive de la liaison Substrat-espaceur. Ci-dessous nous présentons le principe général d'une élimination par cascade électronique (Figure 30).<sup>[139]</sup>

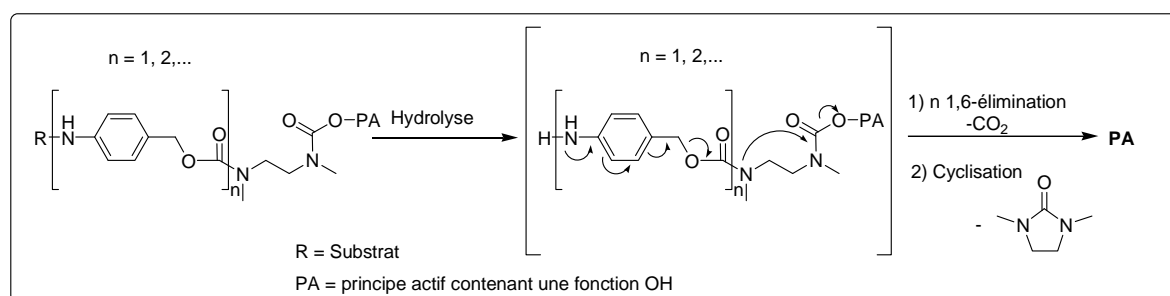
La première étape d'activation consiste en une hydrolyse passive ou enzymatique selon l'une des méthodes de libération décrites précédemment. Ensuite, la libération du PA est le résultat d'une cascade électronique.



**Figure 30 : auto-élimination par cascade électronique.**

Ce type de libération pourrait être également couplé à une élimination par cyclisation (Figure 31). Les auteurs ont montré que l'allongement de l'espaceur et l'ajout d'un espaceur *bis*-amine permet d'accélérer l'activation des enzymes (protéases) pour le clivage du substrat

(tripeptide) suivie de la cascade électronique, puis la cyclisation et enfin le clivage du principe actif.<sup>[139]</sup>



**Figure 31 : Auto-élimination par cascade électronique suivie par une cyclisation.**

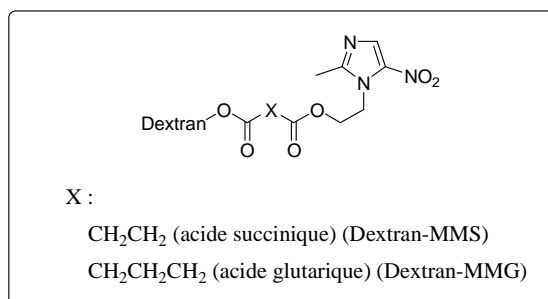
(ii.) Exemples d'espaceurs pour des conjugués macromoléculaires

L'espaceur entre la macromolécule et le PA a jusqu'ici été employé principalement pour permettre le greffage covalent du PA dans les cas où les groupes fonctionnels de l'agent actif et/ou le vecteur n'ont pas permis un lien direct entre ces deux derniers. Dans ce paragraphe, nous allons rappeler quelques exemples d'espaceurs les plus utilisés dans la littérature pour coupler un principe actif à une macromolécule. Nous nous focaliserons sur les principes actifs contenant une fonction hydroxyle et plus spécifiquement les taxanes (ex. paclitaxel), qui font l'objet d'intérêt premier de notre projet.

La simplicité de synthèse accompagnée par l'hydrolyse enzymatique facile place les liaisons esters comme un premier choix pour la conception de prodrogues. Ces types de liens ont été largement employés pour la modification de principes actifs contenant des groupements hydroxyle ou des groupements carboxyliques.<sup>[140]</sup>

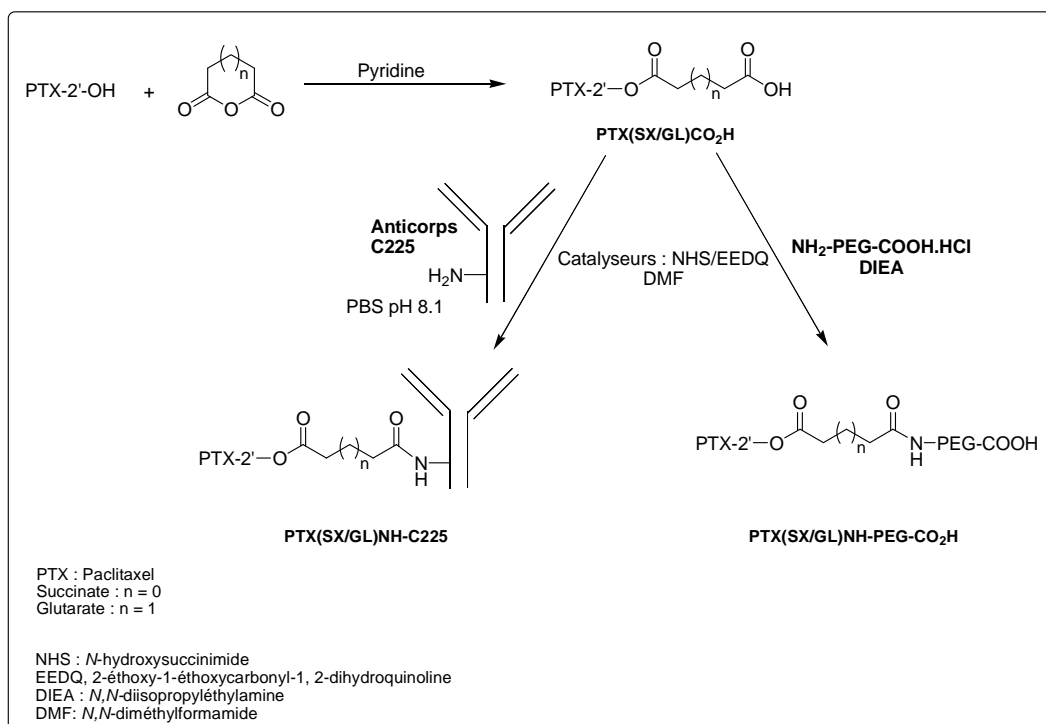
L'acide dicarboxylique (espaceur bipartite) est souvent utilisé pour coupler des PA contenant un groupement hydroxyle à des macromolécules présentant aussi une ou plusieurs fonctions hydroxyle, tels que les dextrans (des polysaccharides ramifiés de glucose). C'est le cas de l'étude de Larsen *et al.* en 1988 où ils ont utilisé les acides succinique et glutarique pour lier le métronidazole au dextran (Figure 32).<sup>[141]</sup> L'espaceur glutarique a montré une vitesse de libération dans le plasma humain 50 fois plus rapide que dans un tampon PBS pH 7.4. Ce résultat prouve que l'hydrolyse de l'espaceur glutarique se fait principalement par un mécanisme enzymatique. L'espaceur succinique a montré quant à lui un clivage non-enzymatique plus lent que l'espaceur glutarique. L'ordre de vitesse de libération a été inversé

en utilisant un homogénat de foie de porc comme milieu d'hydrolyse. Cette observation montre que la vitesse d'hydrolyse dépend du milieu et donc des enzymes mises en jeu.



**Figure 32 : Prodrogue de Dextran-espaceur-métronidazole.**

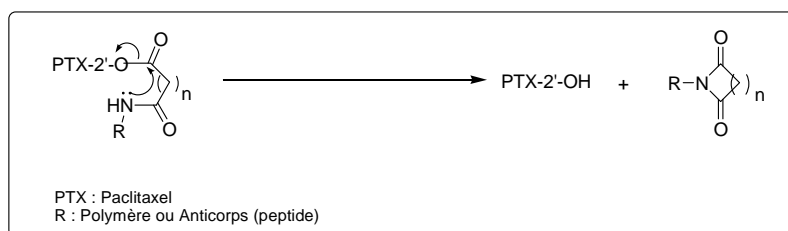
Les mêmes espaceurs ont été également utilisés plus tard par Safavy *et al.* pour coupler le paclitaxel à un anticorps (ou une chaîne de PEG) présentant une fonction -NH<sub>2</sub> (Figure 33).<sup>[142;143]</sup> Le couplage de l'espaceur se fait préalablement avec le principe actif par ouverture de cycle de l'anhydride en présence de la pyridine comme catalyseur. Ensuite, le conjugué est couplé à l'anticorps-NH<sub>2</sub> (ou à la chaîne de PEG-NH<sub>2</sub>).



**Figure 33 : Schéma de synthèse du conjugué espaceur-2'-Paclitaxel.**

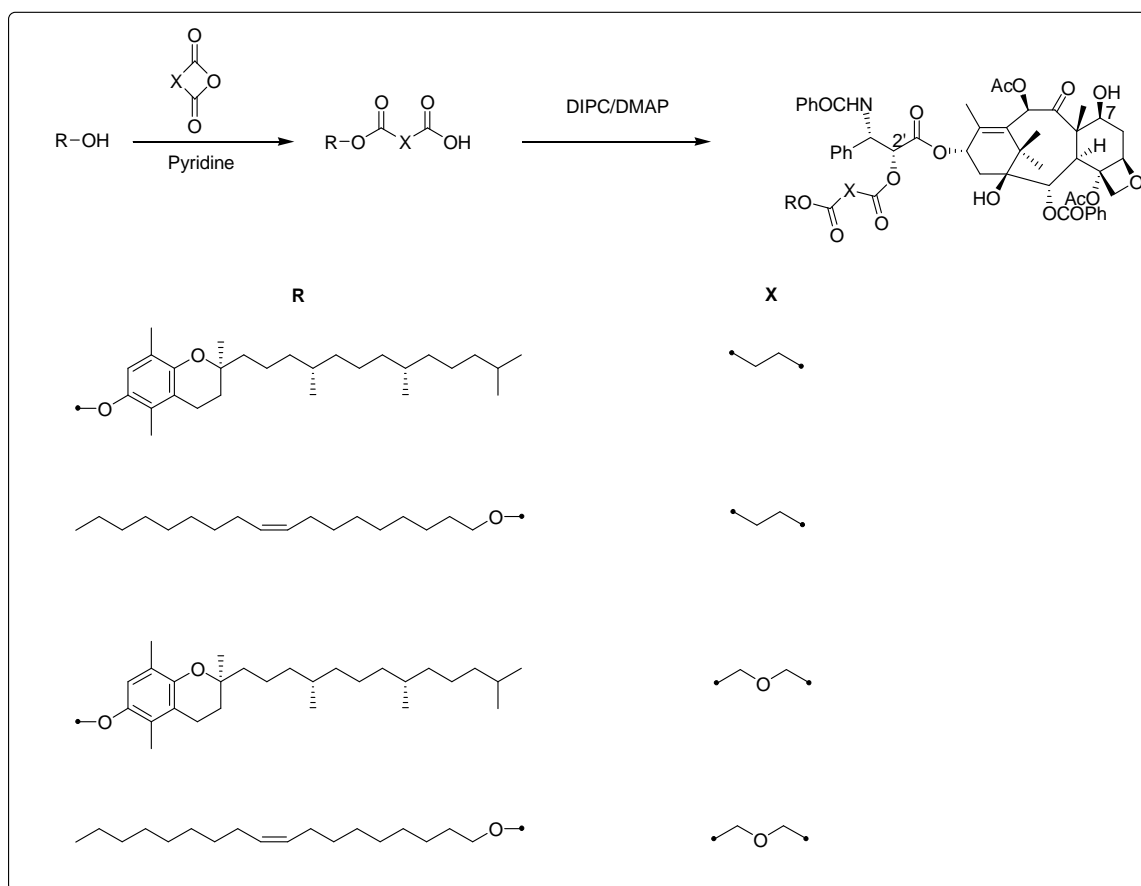
L'espaceur glutarique a montré une vitesse de libération du PA dans le sérum humain beaucoup plus lente que l'espaceur succinique (~ 44 h *vs* ~ 2.6 h, avec la chaîne de PEG).<sup>[143]</sup> Ce résultat est en accord également avec les conjugués à base d'anticorps. La différence de la

vitesse de libération du PA peut être expliquée par la longueur de chaîne entre les deux esters de l'espaceur ( $n = 2$  et  $n = 3$ ). Les auteurs postulent un mécanisme de libération du paclitaxel par réaction de fermeture de cycle et élimination d'un imide (Figure 34). Dans un tel processus, la cyclisation est gouvernée par l'entropie de l'état de transition. La formation d'un cycle à 5 chaînons (succinique,  $n = 2$ ) est en effet favorisée par rapport au cycle à 6 chaînons (glutarique,  $n = 3$ ).<sup>[143;144]</sup>



**Figure 34 : Mécanisme de clivage des espaceurs succinique ( $n = 2$ ) et glutarique ( $n = 3$ ).**

Dans une autre étude, le paclitaxel a été couplé à des macromolécules lipophiles via un espaceur glycolique ou un espaceur succinique (Figure 35).<sup>[145]</sup> Ces conjugués ont été ensuite formulés en nanoparticules pour la vectorisation de conjugués de taxanes. Le but de cette étude étant de contrôler l'administration et la pharmacocinétique du paclitaxel.



**Figure 35 : Synthèse des prodrogues lipophiles de paclitaxel.**

La libération du paclitaxel *in vitro* dans le plasma a été étudiée après préparation des nanoparticules. L'espaceur glycolique semble être plus sensible à l'hydrolyse que l'espaceur succinique. Dans le cas de l'espaceur glycolique, 100 % de libération est obtenue après 9h. Dans le cas de l'espaceur succinique, seulement 25 % de PA est libéré après 68h.<sup>[145]</sup> Ceci pourrait être prédit par la labilité relative des deux esters. La présence du groupement -O- en position 3 dans le cas de l'espaceur diglycolique pourrait augmenter son hydrophilie et en même temps augmenter l'espace entre les deux esters, ce qui aiderait l'approche enzymatique et induirait une hydrolyse plus rapide.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la macromolécule qui nous intéresse dans ce projet de thèse est principalement le copolymère biodégradable et biocompatible de PEG-PLA. Il est donc nécessaire d'identifier les espaceurs les plus importants décrits avec les chaînes de PEG et les taxanes.



(iii.) Prodrogues de PEG/Taxane

Les prodrogues le plus souvent employées avec le PEG contiennent principalement des liens de type esters, carbonates, carbamates d'aryle et hydrazones (Figure 36).<sup>[146]</sup> Ces prodrogues sont généralement sujets à une hydrolyse passive ou enzymatique. Le clivage de l'espaceur employé libère le PA et le vecteur inerte.

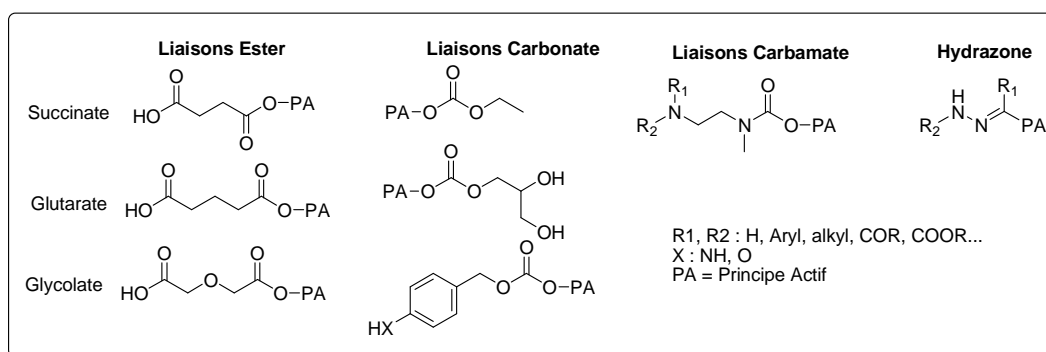


Figure 36 : Exemples d'espaceurs.

Ce type de prodrogues est mentionné comme bipartite, c'est-à-dire que l'espaceur est lié d'un côté au PA et de l'autre côté à la chaîne de PEG. Parmi les prodrogues bipartites, les esters sont les plus présents dans la littérature, sans doute parce qu'ils sont souvent les plus faciles à synthétiser. Ces prodrogues peuvent être conçues à partir d'un PA contenant un groupement hydroxyle conjugué avec un acide, ou d'un PA contenant un acide carboxylique conjugué avec un alcool (Figure 37).



Figure 37 : Deux stratégies de conception des prodrogues d'esters.

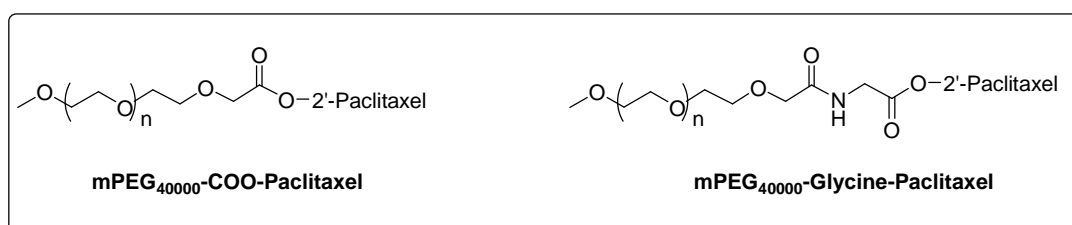
La vitesse d'hydrolyse de l'ester est généralement plus facilement contrôlée, dans le cas d'un PA contenant une fonction hydroxyle, par la modification de la structure acide associée.<sup>[147;148]</sup>

La famille de taxanes a été liée de façon covalente aux chaînes de PEG, via leur hydroxyle libre.<sup>[149]</sup> En effet, l'hydrophilie et la biocompatibilité des macromolécules de PEG permettent

d'améliorer la solubilité du PA dans le sang, de réduire sa toxicité et d'améliorer son efficacité en atteignant le tissu tumoral de manière significative.

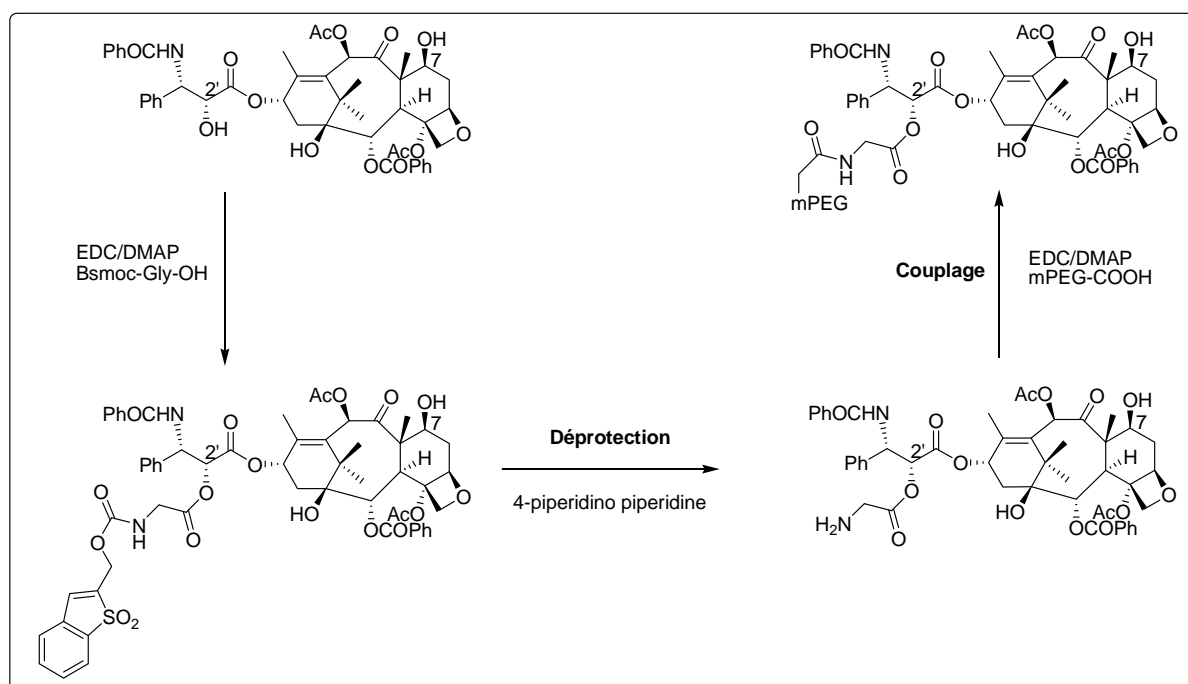
A titre d'exemple, l'estérification du paclitaxel avec un mPEG-acide 40,000 Da permet d'augmenter considérablement l'hydrosolubilité du paclitaxel (Figure 38).<sup>[150]</sup> La demi-vie ( $t_{1/2}$ ) du paclitaxel dans le tampon PBS au pH 7.4 est de 5.5 h, tandis que dans le plasma de rat, une libération plus rapide est observée, avec un  $t_{1/2}$  d'environ 30 minutes. Ce résultat montre encore une fois l'importance des enzymes dans l'hydrolyse des liaisons esters.

L'espaceur de glycine (acide aminé) a été ensuite introduit entre la chaîne de mPEG<sub>40000</sub> et le paclitaxel. La chaîne de mPEG<sub>40000</sub>-glycine a été tout d'abord synthétisée, ensuite couplée au paclitaxel via sa fonction hydroxyle en position 2', pour aboutir à un conjugué mPEG-glycine-paclitaxel relativement stable (Figure 38).<sup>[151]</sup>



**Figure 38 : mPEG-espaceur-paclitaxel.**

Le même groupe a décrit plus tard la synthèse du même conjugué mPEG-glycine-paclitaxel en fonctionnalisant tout d'abord le paclitaxel avec l'espaceur glycine, ensuite en couplant le conjugué glycine-paclitaxel avec la chaîne de mPEG-COOH (Figure 39).<sup>[152]</sup>



**Figure 39 : Schéma de synthèse du conjugué mPEG-glycine-Paclitaxel.**

Le temps de libération du paclitaxel reste quasiment le même pour les deux types de conjugués, en présence ou en absence de l'espaceur glycine (Figure 38) ( $t_{1/2} \sim 30$  minutes, dans le plasma).<sup>[150;151]</sup> Mais, même avec deux profils de libération équivalents *in vitro*, le conjugué mPEG-glycine-paclitaxel montre un meilleur indice thérapeutique *in vivo*. Ce résultat illustre clairement la nécessité des tests *in vivo* pour vérifier les résultats des études *in vitro*. Les mêmes auteurs ont pu montrer que les deux conjugués offrent une meilleure activité anti-tumorale et une plus faible toxicité, par rapport au paclitaxel non conjugué.<sup>[151]</sup>

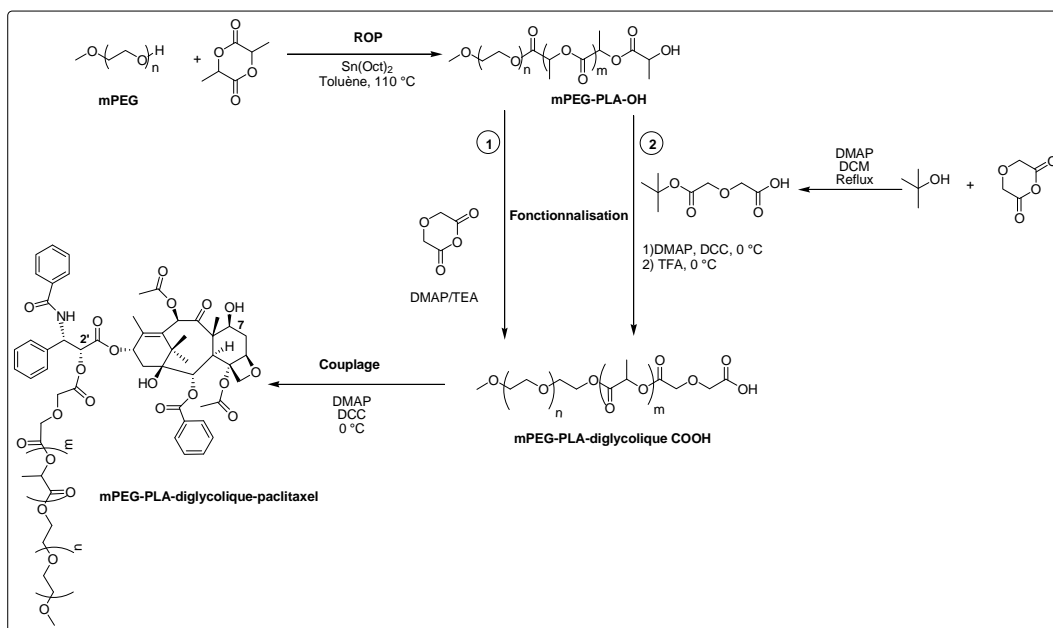
Dans cette introduction, nous avons essayé de montrer l'importance d'un espaceur entre un PA et un vecteur (polymérique ou non). En effet, le choix de l'espaceur dépend de la nature du polymère et du PA, ainsi que de la nature de la cible. En fonction de ces paramètres, la libération du PA pourrait se faire selon différents modes d'hydrolyse : passive, enzymatique, pH-dépendante ou réductive. Dans la littérature, les espaceurs les plus utilisés sont les esters. Ces espaceurs sont clivables facilement, et leur vitesse d'hydrolyse est contrôlée en modifiant leur squelette (succinique, glutarique, diglycolique...).

Dans la section suivante, nous détaillerons les principaux modes de couplage décrits dans la littérature entre les taxanes et les copolymères de PEG-PLA (nature de l'espaceur, position du PA...). Nous discuterons ensuite les propriétés des nanovecteurs obtenus à partir de ces conjugués, en particulier le profil de libération du principe actif.

*b. Encapsulation covalente PEG-PLA/Taxanes*

Classiquement, les taxanes sont liés aux copolymères de PEG-PLA par une réaction de couplage de type estérification. Ce couplage se fait généralement entre le groupement hydroxyle en position C-2' du paclitaxel et l'extrémité de chaîne de PLA liée à un espaceur carboxylique (succinique, diglycolique) (Figure 40).<sup>[85;96;128]</sup> Le copolymère mPEG-PLA est généralement synthétisé par ROP du lactide en partant du macroamorceur mPEG-OH. Cette ROP se déroule dans le toluène en présence du catalyseur métallique Sn(Oct)<sub>2</sub> à 110 °C et dure environ 24 h. L'élimination du catalyseur en fin de réaction se fait classiquement par simple précipitation du produit brut dans l'éther. A notre connaissance, il n'y a jamais eu de quantification du catalyseur restant. Dans certains cas, cette polymérisation n'est pas très bien contrôlée, caractérisée par un haut indice de polydispersité ( $M_w/M_n > 1.3$ ).<sup>[85;128]</sup> Le copolymère mPEG-PLA-OH est ensuite conjugué à l'espaceur pour obtenir un groupement carboxylique terminal. L'incorporation de l'espaceur se fait via l'hydroxyle terminal du PLA soit par ouverture de cycle de l'anhydride carboxylique, soit par estérification avec le dérivé mono-*t*-butylate, suivie par le clivage du groupement *t*-butyle en présence d'acide trifluoroacétique (TFA). (Figure 40). Enfin, le mPEG-PLA-COOH est couplée au principe actif via son groupement hydroxyle.

Le groupement hydroxyle en position C-2' est le moins encombré, il est beaucoup plus réactif que les groupements hydroxyle en positions C-1 et C-7. Le couplage se fait de manière quasi-exclusive au niveau de cette fonction hydroxyle C-2'. Dans certains cas, le taux de couplage n'est pas total même en présence d'un excès de principe actif (2 à 3 équivalents molaires), il est compris entre 50% et 70%.<sup>[85;153]</sup> Malgré ce couplage partiel, cette méthode d'encapsulation covalente permet généralement d'atteindre des taux de charge en principe actif supérieurs à 10% (w/w) quantifiés par RMN <sup>1</sup>H.<sup>[85;96;128;153]</sup>



**Figure 40 : Stratégies de synthèse du conjugué mPEG-PLA-diglycolique-paclitaxel.**

La paclitaxel a été également conjugué tout au long de la chaîne de PLA grâce à l'incorporation aléatoire de quelques unités d'acide glutamique (1 à 7% mol) au sein de la chaîne de PLA.<sup>[154]</sup> Cette incorporation se fait par ROP simultanée du lactide (LA) et du monomère cyclique (3S)-3-benzoxycarbonyl-ethylmorpholine-2,5-dione (BEMD), suivie d'une réaction d'hydrogénation (Figure 41). La copolymérisation est amorcée par une chaîne de HO-PEG-OH en présence d'octanoate d'étain. Les triblocs obtenus (PLGG-PEG-PLGG) présentent une large distribution ( $M_w/M_n$  est situé entre 1.4 et 1.8). Il semble que la présence de BEMD diminue l'efficacité de la ROP et la qualité des polymères synthétisés. Le paclitaxel a été ensuite couplé aux fonctions acides par réaction d'estérification. Le taux d'encapsulation a atteint dans ce cas 16.5% (w/w), sans réel contrôle parce que la proportion d'acide glutamique incorporé n'est pas très bien maîtrisée (entre 40% et 50% d'incorporation).

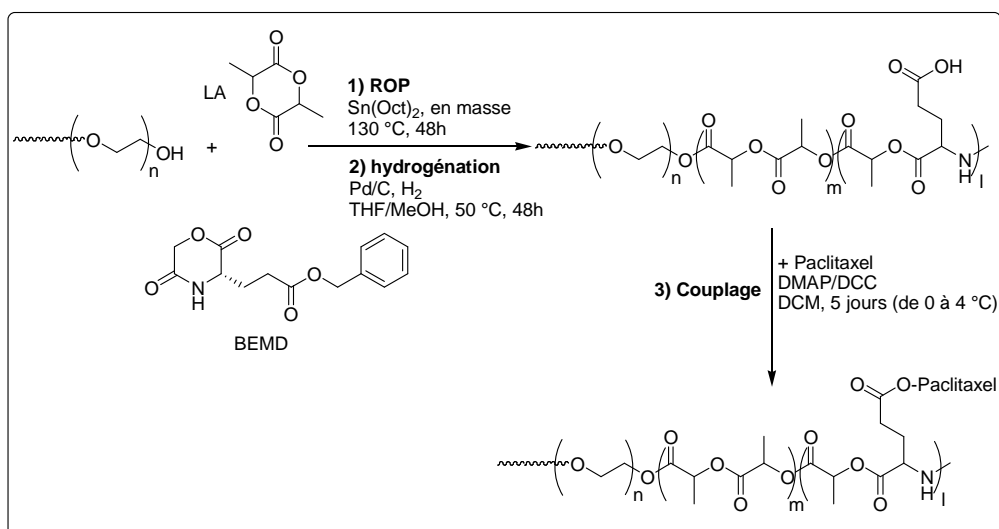


Figure 41 : Stratégie de synthèse du conjugué tribloc (PLGG-paclitaxel)-PEG-(PLGG-paclitaxel).

Dans d'autres cas, les taxanes ont été liés à l'extrémité de chaîne de PLA sans l'utilisation d'espaceur. Dans cette optique, Tong et Cheng ont réussi à concevoir des nanoparticules directement conjuguées au paclitaxel et au docétaxel, avec un taux d'encapsulation élevé, *i.e.* 28 et 35% (w/w) pour le paclitaxel et le docétaxel respectivement.<sup>[155;156]</sup> Cette préparation a été faite en tirant profit du groupement  $-\text{OH}$  en position C-2' du principe actif pour amorcer la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du lactide (Figure 42). La catalyse de la ROP se fait grâce à un complexe métallique à base de Zn ou Mg développé par Coates.<sup>[157]</sup> La ROP du lactide se fait après génération *in situ* du complexe métal-O-taxane, préférentiellement via l'hydroxyle en position C-2' du taxane. Les auteurs ont pu démontrer que l'utilisation d'un complexe métallique comportant des ligands encombrés permet d'atteindre 100% de régiosélectivité en position 2' (100% de PLA-2'-Ptxl). Cette polymérisation s'effectue de manière bien contrôlée en utilisant le complexe de Zn ( $\text{DP } 200$ ,  $M_n = 28\,100\text{ g/mol}$  et  $M_w/M_n \sim 1.02$ ), contrairement au complexe de Mg ( $M_w/M_n \sim 1.47$ ). Le principe actif se trouve en fin de synthèse lié directement à l'extrémité de chaîne de PLA via une liaison ester. En fin de polymérisation, une goutte d'eau est ajoutée au milieu pour hydrolyser la liaison Zn-PLA. Le complexe de zinc est ensuite éliminé par précipitation dans l'éther et lavage avec le MeOH. L'élimination complète du catalyseur a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM).<sup>[156]</sup> Après nanoprécipitation du conjugué PLA-taxane, les nanoparticules sont stabilisées par l'ajout d'un copolymère amphiphile de mPEG-PLGA.

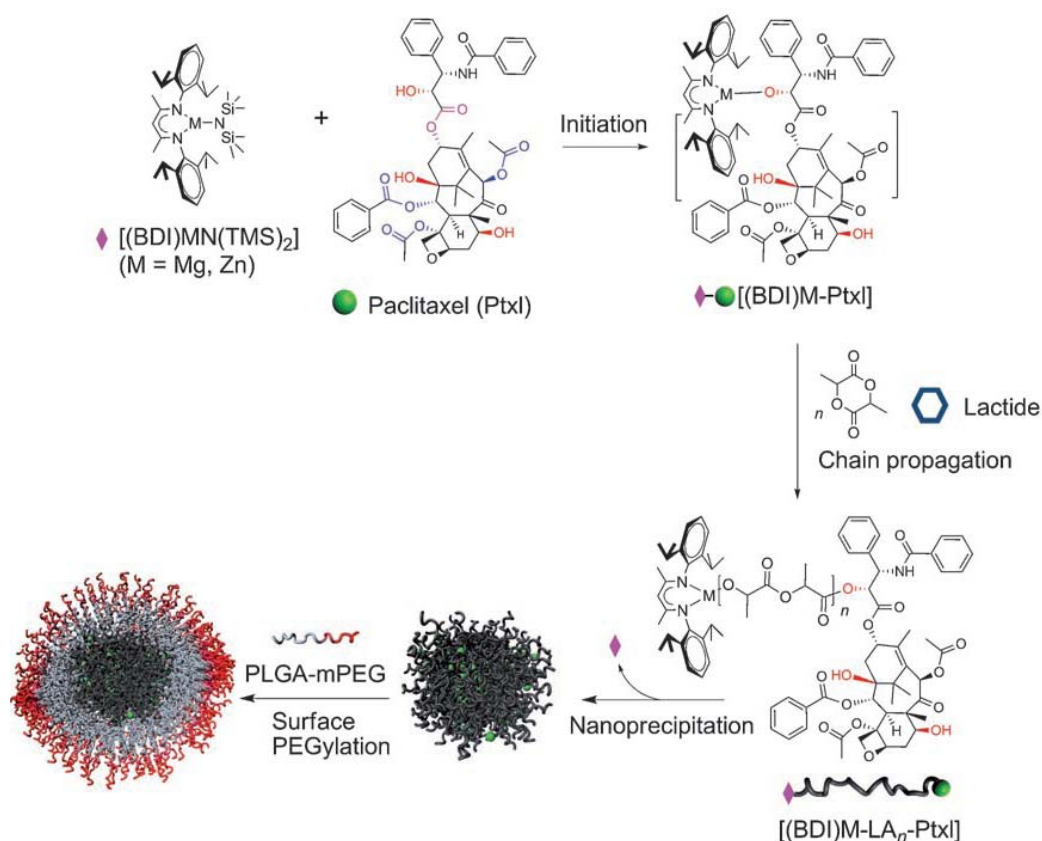


Figure 42 : Préparation de nanoparticules « PEGylées » à base de conjugués Paclitaxel-PLA.<sup>[155]</sup>

La libération du principe actif à partir des nanoparticules a été ensuite étudiée dans un tampon de phosphate (PBS pH 7.4), mimant ainsi le milieu physiologique. Une libération contrôlée de principe actif, sans « burst », a été atteinte à travers une hydrolyse progressive de la liaison ester liant le principe actif au polymère (Figure 43), contrairement à l'encapsulation physique où il y a une libération initiale trop rapide (« burst » de 82% en 24 h). La libération est donc contrôlée par la dégradation de la matrice polymérique, l'hydrolyse de la liaison principe actif/polymère et enfin par la diffusion du principe actif.

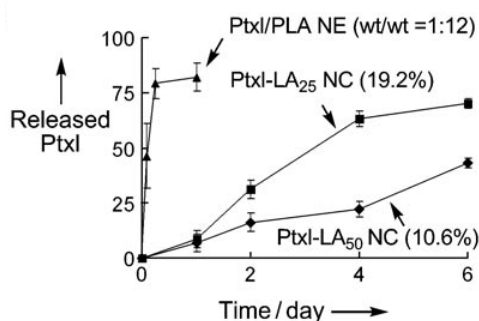
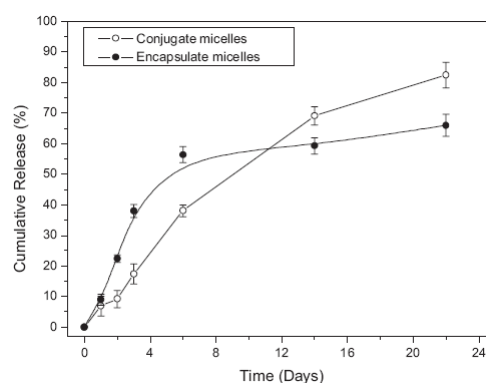


Figure 43 : Libération *in vitro* du paclitaxel (PBS pH 7.4, 37 °C) à partir des nanoparticules à base de PLA : encapsulation physique (Ptxl-PLA NE) et encapsulation covalente (Ptxl-PLA NC), les valeurs entre parenthèses consistent aux taux de charge en paclitaxel.<sup>[155]</sup>

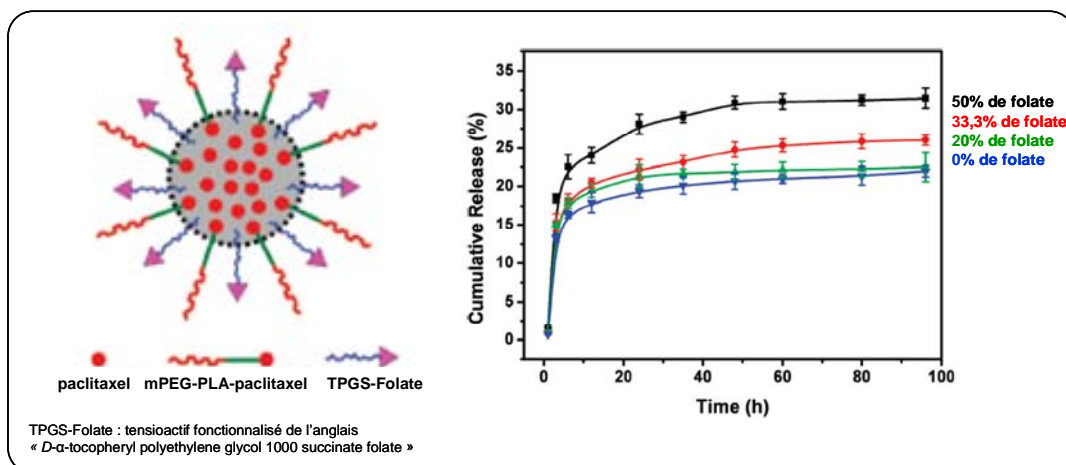
Une autre étude a été menée par Xu *et al.*<sup>[128]</sup> pour comparer les nanoparticules à base de mPEG-PLA encapsulant le paclitaxel de manière physique et covalente. Mais, cette fois-ci le paclitaxel a été couplé en extrémité de chaîne de PLA via un espaceur diglycolique. Les deux types de nanoparticules montrent une morphologie sphérique et une distribution unimodale. La libération *in vitro* du paclitaxel à partir du conjugué montre une libération initiale plus lente comparativement à l'encapsulation physique (40% vs 57%, en 6 jours dans le PBS à pH 7.4) (Figure 44). Le paclitaxel est dissocié du conjugué nanoparticulaire et libéré sans perdre son effet de cytotoxicité.



**Figure 44 : Libération *in vitro* du paclitaxel (PBS pH 7.4, 37 °C) à partir des nanoparticules du conjugué mPEG-PLA-paclitaxel (encapsulation covalente) et du mélange mPEG-PLA/paclitaxel (encapsulation physique).**<sup>[128]</sup>

Par ailleurs, quelques nanoconjugués de Taxane-PLA/PEG ont été également développés en tant que vecteurs de troisième génération. Ces nanoconjugués comportent un ligand (ex. Folate, Aptamère) à leur surface dans le but de cibler des tissus spécifiques.<sup>[153;158]</sup> Dans les deux exemples, le taxane est couplé à l'extrémité de chaîne de PLA et le ligand à la surface hydrophile des nanoparticules (à l'autre extrémité de la chaîne de PEG). La fonctionnalisation des nanoparticules permet d'augmenter la cytotoxicité *in vitro* des formulations, grâce à l'augmentation de la capture cellulaire des nanoparticules. Dans le but d'améliorer également le taux de charge en principe actif, Wang *et al.* ont couplé l'encapsulation covalente et l'encapsulation physique au sein de nanoparticules de 3<sup>ème</sup> génération (Figure 45).<sup>[153]</sup> Les profils de libération du paclitaxel montrent une première région caractérisée par une libération initiale rapide (« burst ») durant 3 heures (inférieure à 20%) et une deuxième région caractérisée par une libération prolongée. Ce « burst » est vraisemblablement lié à la diffusion rapide du paclitaxel encapsulé physiquement. Il est suivi ensuite par le clivage et la diffusion du paclitaxel encapsulé de manière covalente (libération prolongée).





**Figure 45 : Représentation schématique de l'encapsulation physique et covalente au sein de nanoparticules fonctionnalisées (ligand de folate) et profils de libération *in vitro* (PBS pH 7.4 ; en fonction de la proportion massique du ligand).<sup>[153]</sup>**

L'encapsulation covalente permet clairement d'améliorer l'efficacité d'encapsulation, de maîtriser donc le taux de charge en principe actif et d'éviter une libération initiale trop rapide (« burst release »), en comparaison avec l'encapsulation physique. Ce contrôle de la libération du principe actif dépend de la nature chimique de l'espaceur liant le principe actif au polymère.

#### 4. Etudes *in vivo* des Nanoparticules de PLA

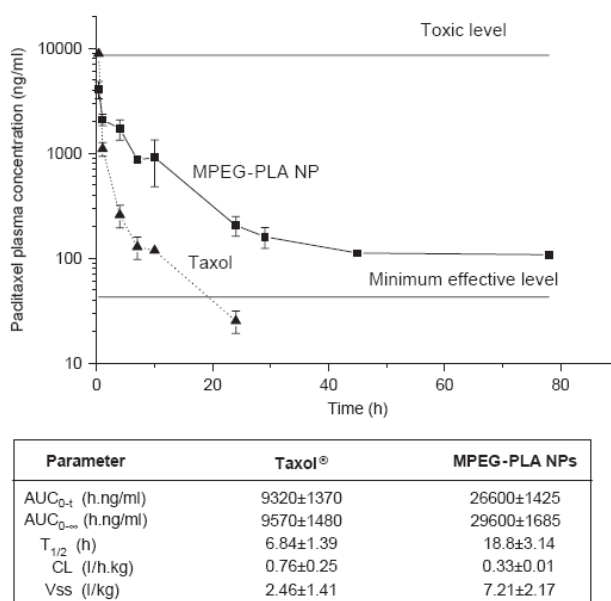
En théorie, le temps de circulation prolongée des nanoparticules polymériques leur permet une accumulation préférentielle dans certains sites biologiques, comportant des anomalies vasculaires (tumeurs et inflammations) grâce à l'effet EPR décrit auparavant. Afin d'atteindre une telle vectorisation passive des tumeurs cancéreuses, la concentration plasmatique du principe actif doit rester suffisamment élevée pendant un temps prolongé, idéalement supérieur à 6 h.<sup>[159]</sup> Burt *et al.*<sup>[44]</sup> ont montré que le paclitaxel, encapsulé dans des micelles de mPEG-PLA, est rapidement libéré *in vivo* (après quelques minutes de l'injection intraveineuse). Le paclitaxel est distribué dans différents organes et est éliminé du corps sous sa forme libre, alors que le copolymère est rapidement capturé par les reins et éliminé dans l'urine ( $t_{1/2} = 2.6$  h). Cette observation a été confirmée par une récente étude utilisant l'imagerie FRET (Transfert d'Energie par Résonance de type Förster).<sup>[11]</sup> Les auteurs ont exploré la cinétique de libération de deux marqueurs lipophiles fluorescents, à partir de micelles de mPEG-PLA (masses moléculaires du mPEG-PLA : 2000-1300, 2000-2000 et 5000-2100 g/mol) après administration intraveineuse chez la souris. L'efficacité FRET a été significativement réduite après injection, ce qui prouve que les marqueurs se sont rapidement

échappés des micelles circulantes. De plus, l'étude FRET *in vitro* a permis d'identifier les protéines responsables de la déstabilisation des micelles. Les  $\alpha$ - et  $\beta$ - globulines jouent un rôle important dans cette déstabilisation, contrairement à l'albumine et aux  $\gamma$ -globulines. Toutes ces études mettent l'accent sur la contradiction qui pourrait exister entre les études *in vivo* de ces nanoparticules et les études de libération *in vitro* qui suggèrent une libération plus ou moins contrôlée. Dans plusieurs cas, le manque de conditions optimales et de protéines plasmatiques, dans les études *in vitro*, peut gêner significativement la libération du principe actif à partir du cœur des nanoparticules.<sup>[160]</sup>

Malgré la déstabilisation et la libération rapide du principe actif dans le cas de certaines formulations micellaires, Genexol-PM<sup>®</sup> montre une meilleure activité anticancéreuse en comparaison avec la formulation classique du paclitaxel. Genexol-PM<sup>®</sup> est une formulation micellaire (30-60 nm) de mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>1750</sub> encapsulant le paclitaxel. Cette formulation montre une cytotoxicité *in vitro* comparable à celle obtenue avec le Taxol.<sup>[45]</sup> Mais, sa dose maximale tolérée (MTD) est 3 fois supérieure à celle de la formulation commerciale. A leurs MTD respectives, l'efficacité *in vivo* du Genexol-PM<sup>®</sup> est significativement supérieure à celle du Taxol<sup>®</sup>, après injection à des souris portant des modèles de cancers de l'ovaire et du sein. L'aire sous la courbe de concentration plasmatique en fonction du temps (AUC, un paramètre qui reflète l'exposition plasmatique du PA) du paclitaxel était similaire avec les deux formulations, mais dans le cas du Genexol-PM<sup>®</sup>, sa biodistribution était 2 à 3 fois supérieure dans les tissus, incluant le foie, la rate, les reins, les poumons, le cœur et la tumeur (au niveau du bras). Genexol-PM<sup>®</sup> a été approuvée en Corée du Sud pour le traitement du cancer des poumons, du cancer de l'ovaire, du cancer du sein et du cancer gastrique.

Comme nous l'avons déjà mentionné, la taille et les propriétés de surface des nanoparticules affectent énormément le comportement de ces nanovecteurs après administration intraveineuse. Contrairement aux nanoparticules micellaires, les nanosphères solides montrent une différente biodistribution. Bazile *et al.*<sup>[20]</sup> ont injecté à des souris des nanosphères marquées au <sup>14</sup>C, à base de mPEG<sub>12000</sub>-PLA<sub>32000</sub>. La demi-vie de ces nanoparticules dans le plasma était de l'ordre de 6 h, avec une accumulation importante dans le foie et la rate. D'autres nanoparticules à base de mPEG-PLA, avec une longue chaîne de PLA (~ 57 kDa) et 8 % (w/w) de mPEG (5 kDa), a permis d'augmenter l'AUC plasmatique du paclitaxel d'un facteur 3 en comparaison avec le Taxol<sup>®</sup> (Figure 46).<sup>[125]</sup> Ces nanoparticules, ayant un

diamètre d'environ 150 nm, montrent une bonne stabilité colloïdale, ce qui rend leur déstabilisation dans le sang difficile.



**Figure 46 : Etude pharmacocinétique *in vivo* du paclitaxel après injection IV du Taxol ou des nanoparticules de mPEG-PLA (n = 6, [Paclitaxel] = 10 mg/kg).<sup>[125]</sup>**

Un résultat similaire a été obtenu avec des nanoparticules à base de mPEG-PLGA (100 nm), encapsulant le docétaxel. L'AUC plasmatique du principe actif était environ 3 fois supérieure à la formulation commerciale Taxotère<sup>®</sup>, accompagné d'une accumulation considérable dans la tumeur solide (5 fois supérieure après 12 h de l'injection IV).<sup>[161]</sup> Feng *et al.* ont aussi décrit une amélioration de l'AUC plasmatique du paclitaxel en utilisant des nanoparticules de TPGS-PLA, en comparaison avec le Taxol<sup>®</sup> (facteur d'environ 1.6).<sup>[124]</sup>

Ainsi, les particules colloïdales solides, préparées à partir des copolymères amphiphiles mPEG-PLA, ont des propriétés de circulation différentes à celles des nanoparticules micellaires préparées à partir des copolymères similaires avec des plus faibles masses moléculaires. En effet, les nanoparticules solides ont un temps de circulation plus long et un caractère furtif plus prononcé.

La fonctionnalisation des nanoparticules avec un ligand à leur surface pourrait améliorer l'efficacité de ces systèmes. Cheng *et al.*<sup>[100]</sup> ont préparé des nanoparticules à base de PEG-PLGA fonctionnalisées avec un aptamère qui est capable de se lier à l'antigène membranaire spécifique au niveau de la prostate. Ces nanovecteurs ont montré une nette amélioration de l'accumulation du paclitaxel au niveau de la tumeur dans un modèle de xénogreffe de cancer

de la prostate chez la souris (3.8 fois), en comparaison avec les nanoparticules non fonctionnalisées. Cette accumulation est gouvernée théoriquement dans les deux cas par l'effet EPR. Mais, la différence d'accumulation peut être expliquée par la lente clairance des nanoparticules fonctionnalisées du tissu tumoral, en raison de l'attachement des nanoparticules aux cellules tumorales via la liaison aptamère-antigène. Dans une étude ultérieure, le système a démontré une nette amélioration de l'efficacité du docétaxel contre la progression tumorale chez des souris portant un cancer de prostate LNCaP (5 sur 7 souris ont montré une régression totale de la tumeur).<sup>[108]</sup> De plus, les nanoparticules fonctionnalisées ont permis d'atteindre un taux de survie de 100% après 109 jours de l'injection, alors qu'avec les autres traitements « contrôles », le taux survie était inférieur à 60%.

Dans la récente étude de Langer *et al.*, l'utilisation de nanoparticules à base de mPEG-PLA et de ACUPA-PEG-PLA [respectivement 97.5 % et 2.5 % (w/w), docétaxel 10 wt %, D ~ 100 nm, potentiel zêta ~ - 6 mV] a permis d'améliorer considérablement la pharmacocinétique du docétaxel, en comparaison avec la formulation Taxotère®.<sup>[74]</sup> La concentration plasmatique du PA encapsulé reste ainsi au moins 100 fois supérieure à celle du taxotère durant plus de 24 heures. Ces nanoparticules ont montré également une meilleure accumulation au niveau de la tumeur accompagnée d'une bien meilleure activité antitumorale *in vivo*, ce qui les placent comme bons candidats pour des études cliniques plus avancées.

Dans le schéma ci-dessous (Figure 47), nous récapitulons les principaux facteurs qui jouent un rôle important dans la biodistribution et la clairance des nanoparticules polymériques. La défection du tissu tumoral, les propriétés de furtivité, le ciblage et la taille des nanoparticules sont les paramètres majeurs mis en jeu.

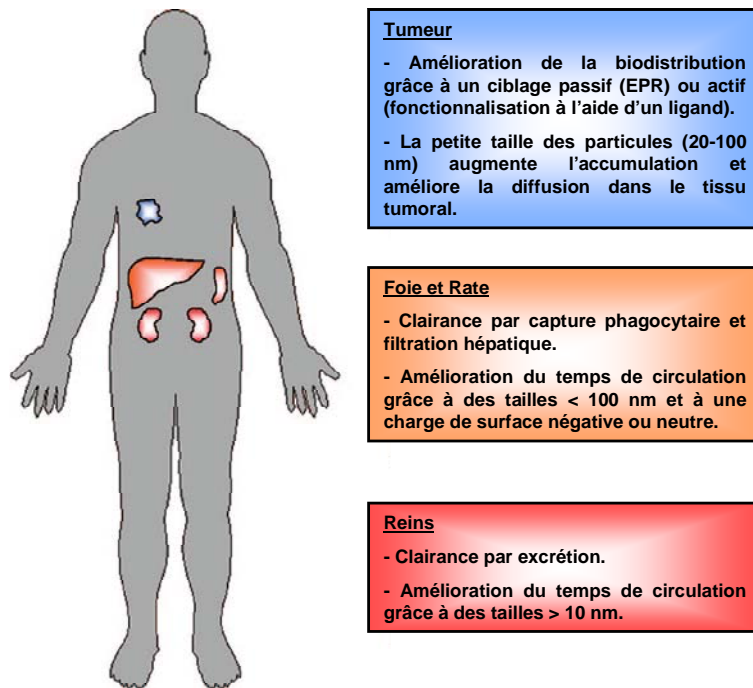


Figure 47 : Facteurs affectant la biodistribution et la clairance des nanoparticules polymériques.<sup>[162]</sup>

## IV. Conclusion

Comme nous l'avons expliqué tout au long de ce chapitre, les nanoparticules à base de PEG-PLA offrent une opportunité intéressante pour la vectorisation de taxanes, pour le traitement de certaines tumeurs cancéreuses. Le caractère biocompatible du PEG et le caractère biodégradable et biocompatible du PLA placent ces copolymères parmi les meilleurs candidats pour leur utilisation en nanomédecine.

Les nanosphères obtenues à partir de ces copolymères ont montré une bonne stabilité *in vitro* et *in vivo*. Une biodistribution préférentielle dans les tumeurs peut être atteinte grâce à la furtivité apportée par la couronne de PEG. Cette couronne, permet de réduire le phénomène d'opsonisation par effet stérique et en minimisant la charge de surface des nanoparticules. Il en résulte donc une circulation sanguine prolongée et une accumulation des nanoparticules au niveau du tissu tumoral.

Cependant, l'encapsulation de principes actifs, type taxanes, pose quelques problèmes. En effet, le taux de charge en taxanes est généralement limité ( $< 5\%$  par la méthode de nanoprécipitation), essentiellement dans le cas d'une encapsulation physique dans le cœur hydrophobe (PLA). Dans certaines conditions, un taux de charge d'environ 14% est atteint avec la méthode d'émulsification. Ce type d'encapsulation cause parfois la perte d'une quantité importante en principe actif, à cause d'une faible efficacité d'encapsulation (dans la majorité des cas inférieure à 50%). Il peut en résulter également une précipitation du principe actif dans le milieu aqueux, ce qui nécessiterait l'utilisation de filtres avant injection intraveineuse. De plus, la libération *in vivo* du principe actif est généralement très rapide et prématurée, avant d'atteindre le site d'action désiré, ce qui cause une importante toxicité. Pour remédier à ces problèmes, l'encapsulation covalente s'est montrée comme une alternative intéressante. Cette méthode a permis de maîtriser le taux de charge en principe actif et d'améliorer considérablement l'efficacité d'encapsulation (proche de 100%). L'encapsulation covalente permet également de limiter la précipitation du principe actif dans le milieu aqueux. La libération du principe actif dans ce cas est généralement plus lente en comparaison avec l'encapsulation physique, et elle est contrôlée par l'hydrolyse de la liaison polymère-taxane, la dégradation de la matrice polymérique et la diffusion du principe actif à travers la matrice. Mais dans la littérature, la structure chimique de ce type de conjugués est généralement mal caractérisée à cause de leur nature macromoléculaire. Dans ce projet, nous

avons essayé d'atteindre des degrés de caractérisation très précis et proches de ceux du moléculaire.

L'idée de notre projet est de tirer profit des avantages de l'encapsulation covalente. Cette stratégie nous permettrait de préparer des nanoparticules avec une encapsulation stoechiométrique bien maîtrisée, en fonction de la masse moléculaire du copolymère utilisé. L'objectif du projet de thèse est également d'améliorer le contrôle de la libération du principe actif. L'idée est en effet de cibler une libération rapide, mais exclusivement dans le tissu tumoral. Pour ce faire, nous proposons d'introduire un espaceur entre le copolymère et le principe actif. Ce système nous permettrait donc d'accéder à une encapsulation stoechiométrique, une précipitation limitée du principe actif et une libération contrôlée avec un profil dépendant de la nature de l'espaceur choisi. Il est désirable aussi d'améliorer l'accessibilité du principe actif pour l'hydrolyse dans le but d'accélérer sa libération. Dans la littérature, les taxanes sont exclusivement couplés aux copolymères PEG-PLA à l'extrémité de chaîne de PLA. Cette position place le principe actif dans le cœur hydrophobe des nanoparticules et limite ainsi l'accessibilité à l'hydrolyse et à la libération. Cette accessibilité peut être améliorée, par exemple, en introduisant le principe actif près de la surface des nanoparticules. Deux stratégies sont possibles : (i) en extrémité de chaîne de PEG et (ii) à l'interface hydrophile/hydrophobe (PEG/PLA). La première option peut poser un problème de stabilité et d'efficacité des nanoparticules. En effet, à cause du caractère très hydrophobe des taxanes, ces derniers auront tendance à se positionner dans le cœur hydrophobe et par conséquent les chaînes de PEG se retrouvent en « boucles » comme dans le cas des copolymères tribloc de PLA-PEG-PLA. Les chaînes de PEG deviendraient ainsi moins mobiles et perdraient leurs caractères de protection et de « furtivité ». La deuxième stratégie peut être atteinte avec l'introduction d'un groupement fonctionnel entre les chaînes de PEG et de PLA permettant le couplage avec un PA. Cette conception de conjugués avec une architecture de type Y sera détaillée dans le chapitre II.

Cette position pourrait nous permettre de préparer des nanoparticules avec un cœur hydrophobe de PLA une couronne hydrophile de PEG et un principe actif à l'interface hydrophile/hydrophobe. Cette position rendrait le principe actif très accessible à l'hydrolyse spécifique et non-spécifique, en fonction de l'espaceur choisi. Cette répartition serait probablement différente de celle des conjugués linéaires où le principe actif serait piégé dans le centre du cœur hydrophobe.

Dans le Chapitre II, nous détaillerons la stratégie de synthèse adoptée pour préparer les différents conjugués mPEG-PLA/Taxane de structure Y et linéaire. Différentes tailles de PLA ainsi que différents espaceurs seront explorés. Tous ces conjugués, ainsi que leurs intermédiaires, seront caractérisés à l'aide de différentes techniques afin de s'assurer de leur pureté.

Dans le Chapitre III, nous décrirons la préparation de nanoparticules à partir des conjugués de structure linéaire et de structure Y. Une étude comparative sera donc menée avec les deux structures. Cette étude concerne les propriétés physico-chimiques des nanoparticules : taille, surface de charge, concentration micellaire critique. Ensuite, nous étudierons l'influence de la position du PA au sein des conjugués sur sa répartition dans les nanoparticules. Enfin, nous détaillerons les profils de libération du principe actif *in vitro* (dans le plasma et dans un tampon) en comparant les deux structures linéaires et Y.



## Références

- [1] T. L. Doane, C. Burda, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2885-2911.
- [2] I. Brigger, C. Dubernet, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, *54*, 631-651.
- [3] K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2562-2574.
- [4] The Royal Society & The Royal Academy of Engineering. Nanoscience and nanotechnologies : opportunities and uncertainties. 2004.
- [5] M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**.
- [6] P. Artursson, I. Sjöholm, *Int. J. Pharm.* **1986**, *32*, 165-170.
- [7] G. Borchard, J. Kreuter, *J. Drug Targeting* **1993**, *1*, 15-19.
- [8] K. Taroh, *Immunology Today* **1991**, *12*, 291-295.
- [9] M. Hector, *Rheum. Dis. Clin. N. Am* **2004**, *30*, 1-18.
- [10] J. A. Barreto, W. O' Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan, L. Spiccia, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, H18-H40.
- [11] H. Chen, S. Kim, W. He, H. Wang, P. S. Low, K. Park, J. X. Cheng, *Langmuir* **2008**, *24*, 5213-5217.
- [12] A. E. Felber, B. Castagner, M. Elsabahy, G. F. Deleavey, M. J. Damha, J. C. Leroux, *J. Controlled Release* **2011**, *152*, 159-167.
- [13] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, P. Simard, J. C. Leroux, J. P. Benoit, *J. Biomed. Mater. Res. , Part A* **2006**, *78A*, 620-628.
- [14] T. G. Iversen, T. Skotland, K. Sandvig, *Nano Today* **2011**, *6*, 176-185.
- [15] H. Maeda, L. W. Seymour, Y. Miyamoto, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*, 351-362.
- [16] J. Wang, J. D. Byrne, M. E. Napier, J. M. DeSimone, *Small* **2011**, *7*, 1919-1931.
- [17] F. Zhao, Y. Zhao, Y. Liu, X. Chang, C. Chen, Y. Zhao, *Small* **2011**, *7*, 1322-1337.
- [18] P. Aggarwal, J. B. Hall, C. B. McLeland, M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 428-437.
- [19] D. E. Owens III, N. A. Peppas, *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93-102.
- [20] D. Bazile, C. Prud'homme, M. T. Bassoullet, M. Marlard, G. Spenlehauer, M. Veillard, *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 493-498.
- [21] M. T. Peracchia, C. Vauthier, C. Passirani, P. Couvreur, D. Labarre, *Life Sciences* **1997**, *61*, 749-761.
- [22] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids Surf. , B* **2000**, *18*, 301-313.
- [23] P. P. Adiseshaiah, J. B. Hall, S. E. McNeil, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2010**, *2*, 99-112.
- [24] P. Couvreur, J. Delattre, F. Puisieux, *Les liposomes: aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques*, les Ed. INSERM, **1993**.

- [25] U. Boas, P. M. H. Heegaard, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, 33, 43-63.
- [26] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Frechet, F. C. Szoka, *Nat. Biotech.* **2005**, 23, 1517-1526.
- [27] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 674-679.
- [28] L. Silvio, R. G. Courteney-Harris, S. Downes, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* **1994**, 5, 819-823.
- [29] A. E. de Salamanca, Y. Diebold, M. Calonge, C. Garcia-Vazquez, S. Callejo, A. Vila, M. J. Alonso, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **2006**, 47, 1416-1425.
- [30] K. Tahara, S. Furukawa, H. Yamamoto, Y. Kawashima, *Int. J. Pharm.* **2010**, 392, 311-313.
- [31] G. Lambert, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, A. Gulik, P. Couvreur, *Pharm. Res.* **2000**, 17, 707-714.
- [32] T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozzi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* **2006**, 325, 172-179.
- [33] R. N. Alyautdin, V. E. Petrov, K. Langer, A. Berthold, D. A. Kharkevich, J. Kreuter, *Pharm. Res.* **1997**, 14, 325-328.
- [34] R. N. Alyautdin, A. Reichel, R. Löbenberg, P. Ramge, J. Kreuter, D. J. Begley, *J. Drug Targeting* **2001**, 9, 209-221.
- [35] J. Kreuter, P. Ramge, V. Petrov, S. Hamm, S. E. Gelperina, B. Engelhardt, R. Alyautdin, H. von Briesen, D. J. Begley, *Pharm. Res.* **2003**, 20, 409-416.
- [36] P. Calvo, B. Gouritin, H. Chacun, D. Desmaële, J. D'Angelo, J. P. Noel, D. Georgin, E. Fattal, J. P. Andreux, P. Couvreur, *Pharm. Res.* **2001**, 18, 1157-1166.
- [37] P. Calvo, B. Gouritin, H. Villarroja, F. Eclancher, C. Giannavola, C. Klein, J. P. Andreux, P. Couvreur, *Eur. J. Neuro.* **2002**, 15, 1317-1326.
- [38] G. Gaucher, M. H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, J. C. Leroux, *J. Controlled Release* **2005**, 109, 169-188.
- [39] C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, C. F. Nostrum, *J. Controlled Release* **2007**, 120, 131-148.
- [40] Martin Malmsten, in *Surfactants and Polymers in Drug Delivery* Ed.: Marcel Dekker), Informa Healthcare, **2002**.
- [41] A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, J. P. Benoit, *Biomaterials* **2006**, 27, 4356-4373.
- [42] G. Kwon, S. Suwa, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, *J. Controlled Release* **1994**, 29, 17-23.
- [43] K. Kataoka, T. Matsumoto, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, S. Fukushima, K. Okamoto, G. S. Kwon, *J. Controlled Release* **2000**, 64, 143-153.
- [44] H. M. Burt, X. Zhang, P. Toleikis, L. Embree, W. L. Hunter, *Colloids Surf. , B* **1999**, 16, 161-171.
- [45] S. C. Kim, D. W. Kim, Y. H. Shim, J. S. Bang, H. S. Oh, S. W. Kim, M. H. Seo, *J. Controlled Release* **2001**, 72, 191-202.
- [46] R. T. Liggins, H. M. Burt, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2002**, 54, 191-202.
- [47] T. J. Martin, K. Prochazka, P. Munk, S. E. Webber, *Macromolecules* **1996**, 29, 6071-6073.
- [48] Y. Zhao, *Macromolecules* **2012**, 45, 3647-3657.

- [49] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Müller, J. M. Verbavatz, R. Langer, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1995**, *16*.
- [50] C. Pinto Reis, R. J. Neufeld, J. Antonio, F. Veiga, *Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 2[1], 8-21. 1-3-**2006**.
- [51] S. Galindo-Rodriguez, E. Allemann, H. Fessi, E. Doelker, *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 1428-1439.
- [52] T. Riley, S. Stolnik, C. R. Heald, C. D. Xiong, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, S. C. Purkiss, R. J. Barlow, P. R. Gellert, *Langmuir* **2001**, *17*.
- [53] C. R. Heald, S. Stolnik, K. S. Kujawinski, C. De Matteis, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, S. C. Purkiss, R. J. Barlow, P. R. Gellert, *Langmuir* **2002**, *18*, 3669-3675.
- [54] W. J. Gradishar, *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 1041-1053.
- [55] C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* **2009**, *26*.
- [56] J. S. Lee, J. Feijen, *J. Controlled Release* .
- [57] Z. Lu, J. Bei, S. Wang, *J. Controlled Release* **1999**, *61*, 107-112.
- [58] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1-R4.
- [59] T. Ameller, V. Marsaud, P. Legrand, R. Gref, G. Barratt, J. M. Renoir, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1063-1070.
- [60] B. M. Discher, Y. Y. Won, D. S. Ege, J. C. M. Lee, F. S. Bates, D. E. Discher, D. A. Hammer, *Science* **1999**, *284*, 1143-1146.
- [61] J. S. Katz, S. Zhong, B. G. Ricart, D. J. Pochan, D. A. Hammer, J. A. Burdick, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3654-3655.
- [62] F. Ahmed, D. E. Discher, *J. Controlled Release* **2004**, *96*, 37-53.
- [63] F. Meng, C. Hiemstra, G. H. M. Engbers, J. Feijen, *Macromolecules* **2003**, *36*, 3004-3006.
- [64] F. Ahmed, R. I. Pakunlu, A. Brannan, F. Bates, T. Minko, D. E. Discher, *J. Controlled Release* **2006**, *116*, 150-158.
- [65] K. A. Athanasiou, G. G. Niederauer, C. M. Agrawal, *Biomaterials* **1996**, *17*, 93-102.
- [66] Y. Kimura, K. Shirotani, H. Yamane, T. Kitao, *Macromolecules* **1988**, *21*, 3338-3340.
- [67] B. Gupta, N. Revagade, J. Hilborn, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 455-482.
- [68] E. T. H. Vink, K. R. Rabago, D. A. Glassner, P. R. Gruber, *Polym. Degrad. Stab.* **2003**, *80*, 403-419.
- [69] J. P. Puaux, I. Banu, I. Nagy, G. Bozga, *Macromol. Symp.* **2007**, *259*, 318-326.
- [70] Y. Tokiwa, B. Calabia, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *72*, 244-251.
- [71] A. Nguyen, V. Marsaud, C. Bouclier, S. Top, A. Vessieres, P. Pigeon, R. Gref, P. Legrand, G. Jaouen, J.-M. Renoir, *Int. J. Pharm.* **2008**, *347*.
- [72] G. Ruan, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2003**, *24*.

- [73] T. Verrecchia, G. Spenlehauer, D. V. Bazile, A. Murry-Brelier, Y. Archimbaud, M. Veillard, *J. Controlled Release* **1995**, 36, 49-61.
- [74] J. Hrkach, D. Von Hoff, M. M. Ali, E. Andrianova, J. Auer, T. Campbell, D. De Witt, M. Figa, M. Figueiredo, A. Horhota, S. Low, K. McDonnell, E. Peeke, B. Retnarajan, A. Sabnis, E. Schnipper, J. J. Song, Y. H. Song, J. Summa, D. Tompsett, G. Troiano, T. Van Geen Hoven, J. Wright, P. LoRusso, P. W. Kantoff, N. H. Bander, C. Sweeney, O. C. Farokhzad, R. Langer, S. Zale, *Sci. Transl. Med* **2012**, 4, 128ra39.
- [75] D. Bazile, C. Ropert, P. Huve, T. Verrecchia, M. Mariard, A. Frydman, M. Veillard, G. Spenlehauer, *Biomaterials* **1992**, 13, 1093-1102.
- [76] T. Verrecchia, P. Huve, D. Bazile, M. Veillard, G. Spenlehauer, P. Couvreur, *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, 27, 1019-1028.
- [77] E. Allemann, P. Gravel, J. C. Leroux, L. Balant, R. Gurny, *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 37, 229-234.
- [78] L. Illum, S. S. Davis, R. H. Müller, E. Mak, P. West, *Life Sciences* **1987**, 40, 367-374.
- [79] S. D. Tröster, J. Kreuter, *J. Microencapsulation* **1992**, 9, 19-28.
- [80] D. Bazile, J. P. Michalon C. Prud'homme G. Spenlehauer M. Veillard. Nanoparticules ayant un temps de capture par le système réticulo-endothélial allongé. [FR2678168A1]. 1991.
- [81] F. Chellat, Y. Merhi, A. Moreau, L. Yahia, *Biomaterials* **2005**, 26, 7260-7275.
- [82] Q. He, J. Liu, X. Sun, Z. R. Zhang, *World J. Gastroenterol.* **2004**, 10, 660-663.
- [83] R. Tyagi, S. Lala, A. K. Verma, A. K. Nandy, S. B. Mahato, A. Maitra, M. K. Basu, *J. Drug Targeting* **2005**, 13, 161-171.
- [84] D. Venturoli, B. Rippe, *Am. J. Physiol. -Ren. Physiol.* **2005**, 288, F605-F613.
- [85] X. Zhang, Y. Li, X. Chen, X. Wang, X. Xu, Q. Liang, J. Hu, X. Jing, *Biomaterials* **2005**, 26.
- [86] S. S. Shah, K. J. Zhu, C. G. Pitt, *J. Biomater. Sci. , Polym. Ed.* **1994**, 5, 421-431.
- [87] H. Fessi, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, C. Thies, Preparation process for disperse colloidal systems from a substance in the shape of nanoparticles, FR19860018446 19861231[FR2608988], **1986**.
- [88] R. Gurny, N. A. Peppas, D. D. Harrington, G. S. Banker, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1981**, 7, 1-25.
- [89] S. Desgouilles, C. Vauthier, D. Bazile, J. Vacus, J. L. Grossiord, M. Veillard, P. Couvreur, *Langmuir* **2003**, 19, 9504-9510.
- [90] G. Spenlehauer, D. Bazile, M. Veillard, C. Prud'Homme, J. P. Michalon, Nanoparticles based on a polyoxyethylene and polyactic acid block copolymer, 08/470,729[US5683723], **1997**.
- [91] M. Vittaz, D. Bazile, G. Spenlehauer, T. Verrecchia, M. Veillard, F. Puisieux, D. Labarre, *Biomaterials* **1996**, 17, 1575-1581.
- [92] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, R. Langer, *Science* **1994**, 263, 1600-1603.
- [93] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade, P. G. De Gennes, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 149-158.
- [94] S. I. Jeon, J. D. Andrade, *J. Colloid Interface Sci.* **1991**, 142, 159-166.

- [95] H. Sahli, J. Tapon-Bretonnière, A. M. Fischer, C. Sternberg, G. Spenlehauer, T. Verrecchia, D. Labarre, *Biomaterials* **1997**, *18*, 281-288.
- [96] Z. Xie, T. Lu, X. Chen, C. Lu, Y. Zheng, X. Jing, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, *105*.
- [97] L. L. Ma, P. Jie, S. S. Venkatraman, *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 716-725.
- [98] P. M. Valencia, M. H. Hanewich-Hollatz, W. Gao, F. Karim, R. Langer, R. Karnik, O. C. Farokhzad, *Biomaterials* **2011**, *32*, 6226-6233.
- [99] F. Gu, L. Zhang, B. A. Teply, N. Mann, A. Wang, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2586-2591.
- [100] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, O. C. Farokhzad, *Biomaterials* **2007**, *28*, 869-876.
- [101] O. C. Farokhzad, S. Jon, A. Khademhosseini, T. N. Tran, D. A. LaVan, R. Langer, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7668-7672.
- [102] H. C. Tsai, W. H. Chang, C. L. Lo, C. H. Tsai, C. H. Chang, T. W. Ou, T. C. Yen, G. H. Hsiue, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2293-2301.
- [103] K. Yasugi, T. Nakamura, Y. Nagasaki, M. Kato, K. Kataoka, *Macromolecules* **1999**, *32*, 8024-8032.
- [104] Y. Nagasaki, K. Yasugi, Y. Yamamoto, A. Harada, K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1067-1070.
- [105] E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Langmuir* **2002**, *18*, 10334-10339.
- [106] E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *14*, 177-186.
- [107] D. H. Yu, Q. Lu, J. Xie, C. Fang, H. Z. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 2278-2292.
- [108] O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6315-6320.
- [109] W. h. Ren, J. Chang, C. h. Yan, X. m. Qian, L. x. Long, B. He, X. b. Yuan, C. s. Kang, D. Betbeder, J. Sheng, P. y. Pu, *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* **2010**, *21*, 2673-2681.
- [110] K. Hu, J. Li, Y. Shen, W. Lu, X. Gao, Q. Zhang, X. Jiang, *J. Controlled Release* **2009**, *134*, 55-61.
- [111] T. Parikh, M. M. Bommana, E. Squillante III, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 442-450.
- [112] D. Sutton, N. Nasongkla, E. Blanco, J. Gao, *Pharm. Res.* **2007**, *24*.
- [113] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- [114] D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, P. Potier, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*.
- [115] I. Ojima, S. D. Kuduk, S. Chakravarty, S. Lin, T. Wang, X. Geng, M. L. Miller, P. Bounaud, E. Michaud, Y. H. Park, C. Sun, J. C. Slater, T. Inoue, C. P. Borella, J. J. Walsh, R. J. Bernacki, P. Pera, J. M. Veith, E. Bombardelli, A. Riva, S. Rao, L. He, G. A. Orr, S. B. Horwitz, S. J. Danishefsky, G. Scambia, C. Ferlini, in *Anticancer Agents*, American Chemical Society, **2001**, p. pp. 59-80.
- [116] E. Harper, W. Dang, R. G. Lapidus, R. I. Garver, *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5*, 4242-4248.
- [117] D. Friedland, G. GORMAN, J. TREAT, *Journal of the National Cancer Institute* **1993**, *85*, 2036.

- [118] A. K. Singla, A. Garg, D. Aggarwal, *Int. J. Pharm.* **2002**, 235.
- [119] X. D. Guo, J. P. K. Tan, S. H. Kim, L. J. Zhang, Y. Zhang, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang, Y. Qian, *Biomaterials* **2009**, 30, 6556-6563.
- [120] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, V. Préat, *J. Controlled Release* **2009**, 133, 11-17.
- [121] C. Fonseca, S. Simoes, R. Gaspar, *J. Controlled Release* **2002**, 83, 273-286.
- [122] Y. Dong, S.-S. Feng, *J. Biomed. Mater. Res. , Part A* **2006**, 78A.
- [123] Y. Dong, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2004**, 25.
- [124] Z. Zhang, S. Lee, C. Gan, S. S. Feng, *Pharm. Res.* **2008**, 25, 1925-1935.
- [125] Y. Dong, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2007**, 28.
- [126] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, *J. Controlled Release* **2001**, 70, 1-20.
- [127] L. Yang, X. Wu, F. Liu, Y. Duan, S. Li, *Pharm. Res.* **2009**, 26.
- [128] X. Xu, X. Zhang, X. Wang, Y. Li, X. Jing, *Polym. Adv. Technol.* **2009**, 20, 843-848.
- [129] H. Soye, E. Schacht, S. Vanderkerken, *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 21, 81-106.
- [130] N. Agarwal, D. H. Rich, *Anal. Biochem.* **1983**, 130, 158-165.
- [131] A. Trouet, R. Baurain, Compounds, pharmaceutical composition and diagnostic device comprising same and their use, *PCT/BE1995/000076[WO/1996/005863]*, 29-2-**1996**.
- [132] T. A. Connors, R. J. Knox, *Stem cells* **1995**, 13, 501-511.
- [133] R. Satchi, T. A. Connors, R. Duncan, *Br. J. Cancer* **2001**, 85, 1070-1076.
- [134] F. Kratz, I. A. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, 3, 20-53.
- [135] W. C. Shen, H. J. P. Ryser, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 102, 1048-1054.
- [136] F. Kratz, U. Beyer, M. T. Schutte, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **1999**, 16, 245-288.
- [137] M. Jaffar, K. J. Williams, I. J. Stratford, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, 53, 217-228.
- [138] W. C. Shen, H. J. Ryser, L. LaManna, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 10905-10908.
- [139] F. M. H. de Groot, W. J. Loos, R. Koekkoek, L. W. A. van Berkum, G. F. Busscher, A. E. Seelen, C. Albrecht, P. de Bruijn, H. W. Scheeren, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8815-8830.
- [140] R. Oliyai, V. J. Stella, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1993**, 33, 521-544.
- [141] C. Larsen, P. Kurtzhals, M. Johansen, *Int. J. Pharm.* **1988**, 41, 121-129.
- [142] A. Safavy, J. A. Bonner, H. W. Waksal, D. J. Buchsbaum, G. Y. Gillespie, R. Arani, D. T. Chen, M. Carpenter, K. P. Raisch, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 302-310.
- [143] A. Safavy, G. I. Georg, D. V. Velde, K. P. Raisch, K. Safavy, M. Carpenter, W. Wang, J. A. Bonner, M. B. Khazaeli, D. J. Buchsbaum, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 1264-1274.

- [144] L. Mandolini, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 550-554.
- [145] S. M. Ansell, S. Johnstone, P. Tardi, L. Mayer, Improved taxane delivery system, [WO/2009/070761], 4-6-**2009**.
- [146] M. Skwarczynski, Y. Hayashi, Y. Kiso, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7253-7269.
- [147] M. L. Bender, R. B. Homer, *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3975-3978.
- [148] I. Christenson, *Acta Chem. Scand.* **1964**, *18*, 904-922.
- [149] R. B. Greenwald, H. Zhao, Eds.: V. J. Stella, R. T. Borchardt, M. J. Hageman, R. Oliyai, H. Maag, J. W. Tilley), Springer New York, **2007**, p. pp. 283-338.
- [150] R. B. Greenwald, C. W. Gilbert, A. Pendri, C. D. Conover, J. Xia, A. Martinez, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*.
- [151] A. Pendri, C. Conover, R. Greenwald, *Anti-Cancer Drug Des.* **1998**, *13*, 387-395.
- [152] R. B. Greenwald, H. Zhao, P. Reddy, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4894-4896.
- [153] J. Wang, W. Liu, Q. Tu, J. Wang, N. Song, Y. Zhang, N. Nie, J. Wang, *Biomacromolecules* **2010**, *12*, 228-234.
- [154] Z. Xie, H. Guan, X. Chen, C. Lu, L. Chen, X. Hu, Q. Shi, X. Jing, *J. Controlled Release* **2007**, *117*.
- [155] J. C. Rong Tong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*.
- [156] R. Tong, J. Cheng, *Macromolecules* **2012**, *45*, 2225-2232.
- [157] B. M. Chamberlain, M. Cheng, D. R. Moore, T. M. Ovitt, E. B. Lobkovsky, G. W. Coates, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3229-3238.
- [158] R. Tong, L. Yala, T. M. Fan, J. Cheng, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3043-3053.
- [159] K. Greish, J. Fang, T. Inutsuka, A. Nagamitsu, H. Maeda, *Clin. Pharmacokinet.* **2003**, *42*, 1089-1105.
- [160] S. D'Souza, P. DeLuca, *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 460-474.
- [161] M. Senthilkumar, P. Mishra, N. K. Jain, *J. Drug Targeting* **2008**, *16*, 424-435.
- [162] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 505-515.





## ***Chapitre II : Préparation des conjugués mPEG-PLA/Taxane***



## I. Introduction

### *1. Identification de la structure cible*

Comme nous l'avons expliqué précédemment, nous avons envisagé de synthétiser des conjugués polymériques, permettant une encapsulation covalente stœchiométrique bien maîtrisée du principe actif (PA). De plus, l'accessibilité du principe actif pour l'hydrolyse et le contrôle de la libération du principe actif sont des points clés pour la conception de nanovecteurs performants.

Dans cet objectif, nous proposons de préparer des copolymères à base de PEG/PLA présentant une structure de type Y, avec un principe actif entre les blocs de PEG et de PLA (Figure 48). Le nœud qui confère la structure de type Y est choisi de manière à pouvoir incorporer le principe actif entre le PEG et le PLA de manière simple et reproductible. Il présente trois groupements fonctionnels : un acide carboxylique et deux hydroxyles, permettant ainsi de conjuguer la chaîne de mPEG-OH par estérification, la chaîne de PLA par polymérisation du lactide (en utilisant une fonction hydroxyle comme amorceur) et l'entité espaceur-PA au niveau du deuxième hydroxyle libre du nœud.

Cette structure permettrait de préparer des nanoparticules avec un cœur hydrophobe de PLA, une couronne hydrophile de PEG et un principe actif à l'interface hydrophile/hydrophobe. Il serait donc plus accessible à l'hydrolyse spécifique et non spécifique, permettant ainsi une libération contrôlée essentiellement par la nature de l'espaceur, contrairement aux encapsulations classiques dans le cœur hydrophobe (conjugués linéaires), pour lesquelles la libération du principe actif est dépendante de la dégradation du cœur, de l'hydrolyse et de la diffusion (Figure 48).<sup>[1-3]</sup>

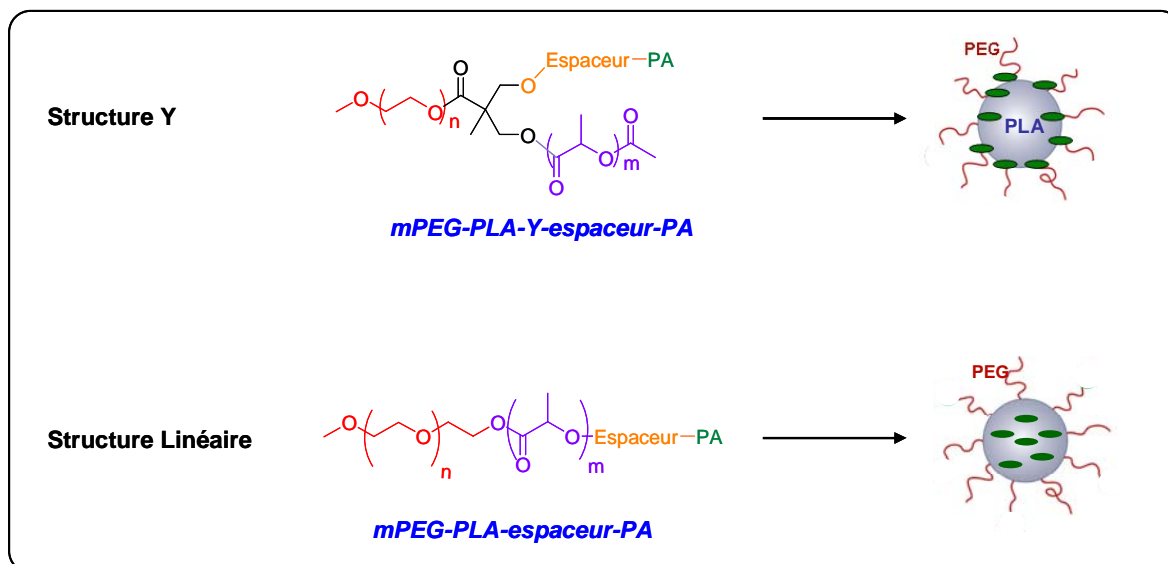


Figure 48 : Structures générales des conjugués cibles (structures Y et linéaire).

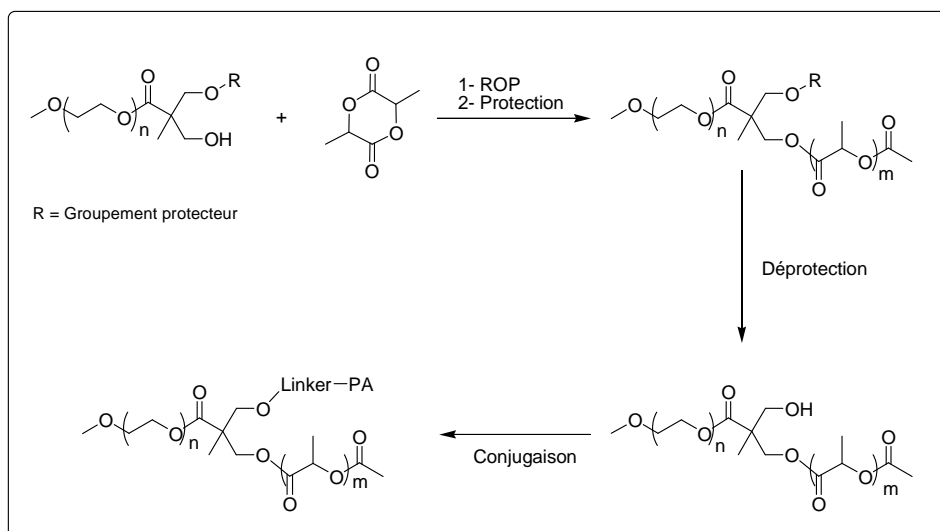
Après avoir mis au point une méthode de synthèse robuste et reproductible avec une caractérisation précise du conjugué mPEG-PLA-Y-espaceur-PA, la synthèse a été transférée chez Sanofi à Vitry-sur-Seine pour produire le conjugué à une plus grande échelle (de l'ordre de 15 g), la variation de la nature de l'espaceur (succinique, diglycolique et glutarique) a aussi été entreprise dans leur laboratoire. Parallèlement à ces conjugués en Y, nous avons préparé des conjugués linéaires contenant le principe actif en extrémité de chaîne de PLA via les différents espaceurs utilisés dans le cas de la structure Y (Figure 48). Ces deux types de conjugués (linéaire et Y) nous permettront d'investiguer l'influence de la position du principe actif sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, sur le profil de libération du principe actif *in vitro* et sur les propriétés pharmacocinétiques *in vivo*.

Comme mentionné dans le Chapitre I, la masse molaire de la chaîne de mPEG est de 2000 g/mol. Cette taille de mPEG donne aux nanoparticules un bon caractère furtif, et permet de limiter la taille du copolymère et ainsi augmenter la charge en principe actif. Dans le but d'étudier l'influence de la longueur de chaîne PLA sur les propriétés des nanoparticules et sur la libération du PA, des copolymères avec des blocs de PLA de masses molaires comprises entre 5000 g/mol et 14400 g/mol seront préparés, le taux de charge en PA résultant sera donc compris entre 5% et 10% (w/w).

## 2. Deux stratégies de synthèse

Pour la conception de copolymères de structure Y, nous avons identifié principalement deux voies de synthèse différentes mettant en jeu plusieurs étapes. Dans les deux cas, l'étape clé est

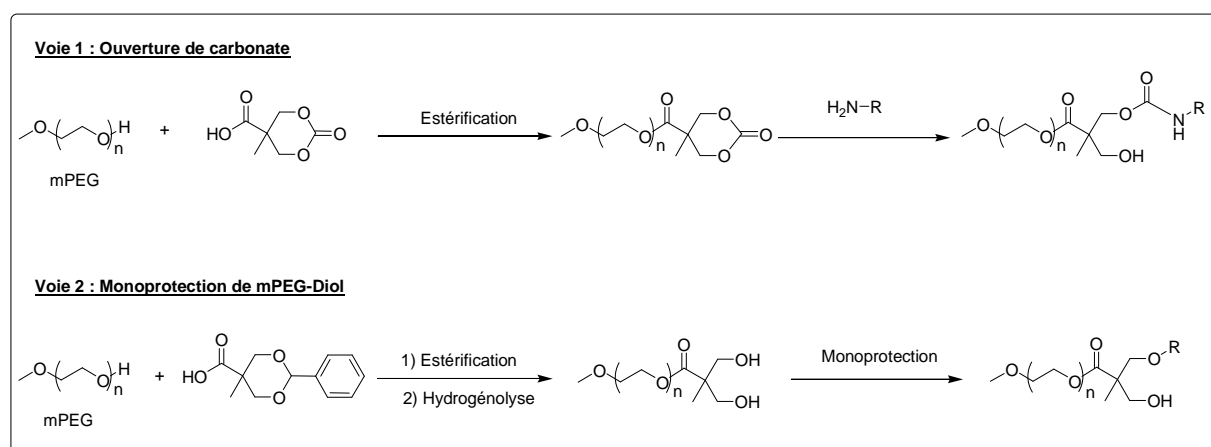
la préparation d'une chaîne de mPEG fonctionnalisée, avec une fonction hydroxyle libre et une autre protégée. La fonction hydroxyle libre nous permettra d'introduire la chaîne de PLA par polymérisation du *D,L*-lactide. L'hydroxyle protégé sera ensuite déprotégé et utilisé afin de coupler le principe actif au copolymère via un espaceur donné (Figure 49).



**Figure 49 : Voie générale de synthèse du conjugué en Y.**

La première voie consiste à fonctionnaliser une chaîne de mPEG-OH avec un groupement carbonate cyclique, puis à ouvrir ce cycle à l'aide d'une amine primaire. Cette stratégie a été utilisée par Waymouth *et al.* dans le but de synthétiser des terpolymères de PEG/PDLA/PLLA de structure Y.<sup>[4]</sup>

La seconde voie consiste à protéger sélectivement et quantitativement un seul hydroxyle d'un mPEG-Diol. Cette protection peut être faite sous forme d'éther silylé (Figure 50).



**Figure 50 : Deux voies de synthèse de la chaîne mPEG fonctionnalisée.**

## II. Synthèse de mPEG fonctionnalisé

### 1. Voie carbonate

La voie de synthèse de cette approche est détaillée dans la Figure 51. Le mPEG-carbonate est synthétisé par une réaction d'estérification mettant en jeu le mPEG-OH et le carbonate cyclique 5-méthyl-5-carboxyl-1,3-dioxan-2-one (MCC). Ce dernier est obtenu en trois étapes à partir de l'acide bis-méthoxy propionique (*bis*-MPA). Dans la première étape nous procédons à la benzylation de la fonction carboxylique du *bis*-MPA.<sup>[5]</sup> Cette réaction conduit à un produit secondaire identifié et quantifié par RMN <sup>1</sup>H à environ 5%. Il s'agit du produit de benzylation d'un des groupements hydroxyle. Le brut est purifié par recristallisation dans le toluène pour obtenir le produit désiré, le 2,2'-méthoxy propionate de benzyle (BnO-MPA), avec un rendement moyen de l'ordre de 43%. Le Diol réagit ensuite avec le triphosgène pour conduire au carbonate benzylé, le 5-méthyl-5-benzyloxycarbonyl-1,3-dioxan-2-one (MBC), avec un rendement quantitatif. La fonction carboxylate est ensuite déprotégée par hydrogénolyse en présence de Palladium sur charbon (Pd/C 10%) et sous pression de 3 bars d'hydrogène, pour conduire au MCC. Ce dernier est couplé au mPEG en présence de N,N-Dicyclohexylecarbodiimide (DCC) dans le THF.

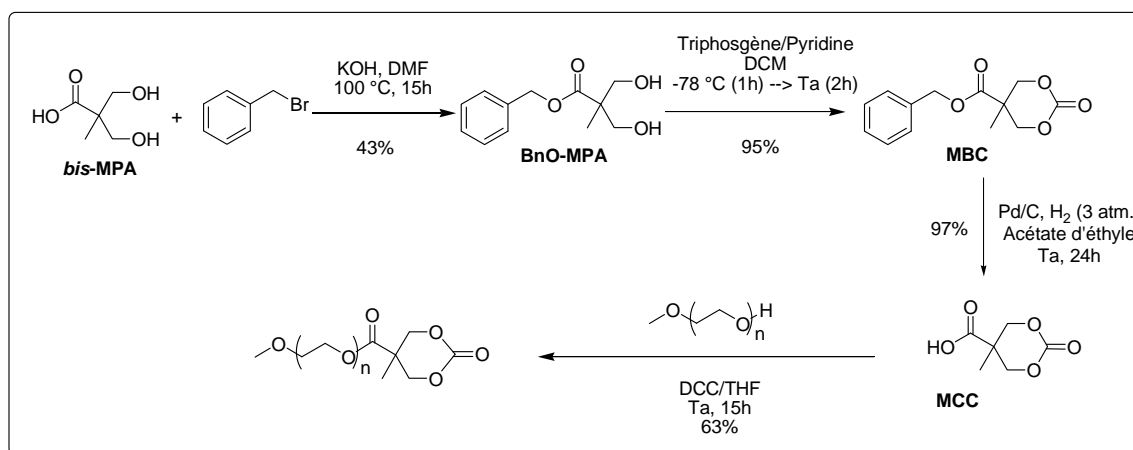


Figure 51 : Synthèse du mPEG-carbonate.

Le mPEG-carbonate obtenu peut être ensuite ouvert avec différents types d'amines primaires.<sup>[6]</sup> Dans un premier temps, nous avons choisi la benzylamine (Figure 52). Le choix de cette amine est lié essentiellement à sa bonne réactivité avec le carbonate.<sup>[6]</sup> Cette réaction d'ouverture se fait dans le chloroforme en présence de 5 équivalents d'amine. Le carbamate obtenu est purifié par plusieurs précipitations dans l'éther diéthylique (Et<sub>2</sub>O) et caractérisé par RMN <sup>1</sup>H, MALDI et SEC.

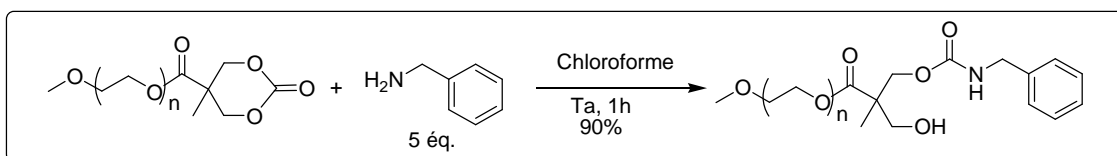


Figure 52 : Ouverture du mPEG-carbonate par Benzylamine.

Ce mPEG-carbamate sera ultérieurement utilisé comme macroamorceur pour la polymérisation du *rac*-lactide. Le carbamate de benzyle sera ensuite éliminé par hydrogénolyse. Nous y reviendrons dans la partie suivante.

## 2. Voie de Synthèse du mPEG-OSiR<sub>3</sub>-Y-OH

La seconde voie de synthèse choisie consiste, comme nous l'avons signalé avant, en une monoprotection sélective d'un mPEG-Diol. La stratégie générale de cette voie est détaillée dans la Figure 53.

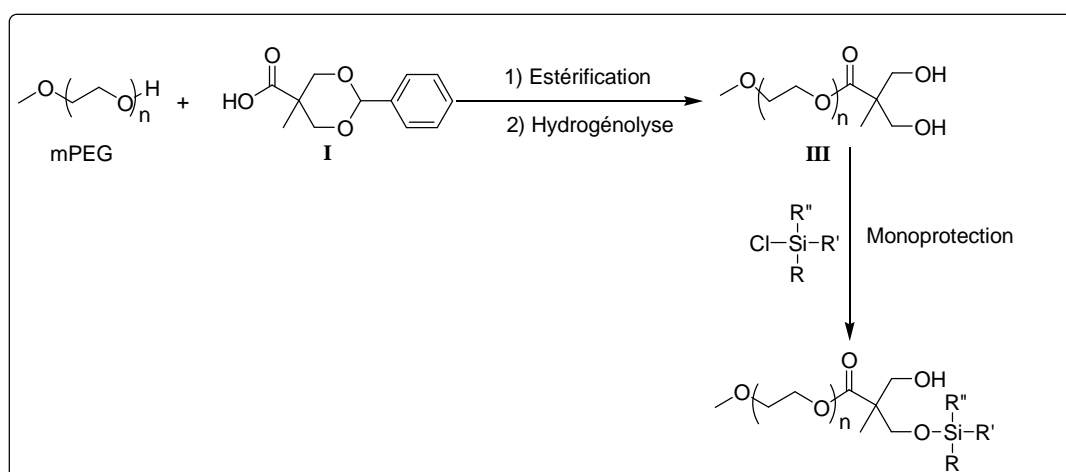


Figure 53 : Stratégie générale de la voie Monoprotection.

Afin de générer le mPEG-Diol, nous avons choisi de partir d'un motif largement utilisé pour la synthèse de dendrimères, le *bis*-MPA.<sup>[7]</sup> Ce dernier est en effet couplé au mPEG-OH. Mais, pour effectuer ce couplage, il est tout d'abord nécessaire de protéger le diol. Cette protection pourrait être conduite avec différents groupements protecteurs. Une première approche consiste à protéger indépendamment chaque hydroxyle par un groupement silylé ou benzyle.<sup>[8-10]</sup> La deuxième approche permet de protéger simultanément les deux hydroxyles sous forme d'un acétal.<sup>[10]</sup> Cette dernière approche est préférable car la synthèse est simple et la déprotection ultérieure du diol se fait par simple hydrogénolyse dans des conditions douces.<sup>[7]</sup>

Le *bis*-MPA protégé est synthétisé selon une procédure décrite antérieurement dans l'équipe.<sup>[11]</sup> Nous avons utilisé l'acide méthanesulfonique (AMS) à la place de l'acide *p*-toluène sulfonique (APTS), classiquement utilisé dans ce type de réaction.<sup>[12;13]</sup> Cette procédure permet ainsi d'accélérer la réaction (3h au lieu de plusieurs jours) (Figure 54).

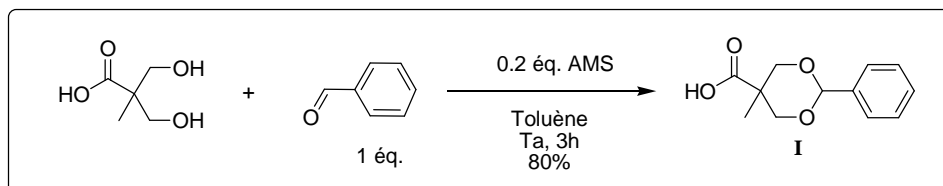


Figure 54 : Synthèse du *bis*-MPA protégé.

Le *bis*-MPA (1.2 équ.) est ensuite couplé au mPEG-OH en présence de *p*-Toluènesulfonate de 4-(diméthylamino)pyridinium (DPTS) et de 1-Ethyl-3-(3'-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI). L'utilisation de l'EDCI, plus soluble, permet d'éviter les impuretés d'urée rencontrées en utilisant le DCC.<sup>[13]</sup> Cette réaction est faite dans le dichlorométhane (DCM) à 40 °C et dure 48 h environ (Figure 55, Voie A). Il est à noter que la réaction nécessite plus de temps pour aller à conversion complète quand la synthèse est faite à plus grande échelle (5 jours pour environ 20 g). Afin d'accélérer la réaction et d'avoir un résultat reproductible, nous avons remplacé le *bis*-MPA par l'anhydride correspondant selon la méthode décrite par Fréchet *et al.*<sup>[7]</sup> (Figure 55, Voie B). Le couplage dans ce cas se fait au bout de 6 h quelque soit l'échelle de la réaction.

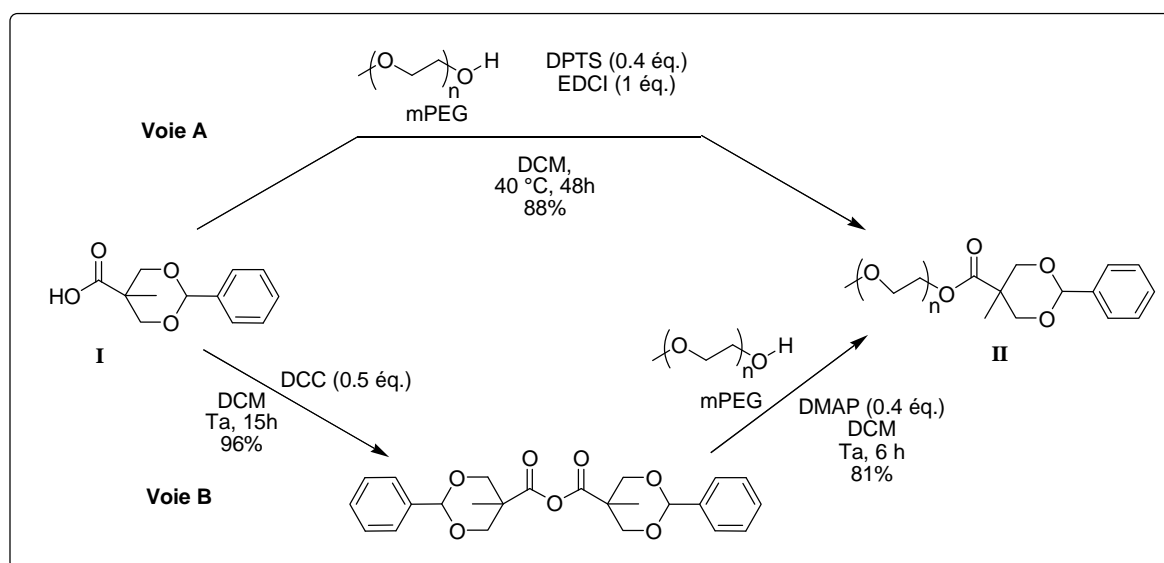
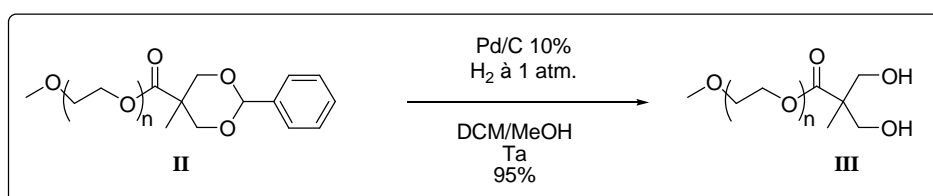


Figure 55 : Couplage de mPEG-OH avec le *bis*-MPA protégé.



La formation du mPEG-diol protégé **II** a pu être suivi par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . En effet, le triplet des deux protons du  $-\text{CH}_2-\text{OH}$  terminal de la chaîne de mPEG-OH (caché par le massif vers 3.6 ppm) se déblinde et apparaît sous forme d'un triplet à 4.36 ppm après couplage avec le produit **I**. Le singulet correspondant au proton du benzyldène, quant à lui, se blinde pour passer de 5.52 ppm à 5.44 ppm. Les signaux aromatiques (5H, 7.32 – 7.42 ppm) confirment aussi l'obtention du produit désiré. Le produit obtenu a été également caractérisé par MALDI-TOF, qui confirme la formation d'une seule population de mPEG avec une extrémité méthoxy et une autre benzyldène (produit **II**) :  $M \text{ (g/mol)} = 15 (\text{CH}_3) + n * 44 (\text{C}_2\text{H}_4\text{O}) + 221 (\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4) + 23 (\text{Na})$ .

Le mPEG benzylé est ensuite déprotégé par hydrogénolyse dans un mélange de DCM/MeOH, en présence de Pd/C 10% sous  $\text{H}_2$  à pression atmosphérique et température ambiante, pour conduire au mPEG-diol avec un bon rendement de l'ordre de 95%. Contrairement au temps de réaction observé à petite échelle (4 h pour 2-3g), pour un scale-up d'environ 15-20g, l'hydrogénolyse n'est complète qu'après 16 h. le produit est purifié par filtration du Pd/C sur célite et évaporation des solvants sous vide. L'élimination du groupement protecteur benzyldène est confirmée par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ , le singulet du benzyldène (5.44 ppm) et les signaux aromatiques (7.32 – 7.42 ppm) ne sont plus détectés.



**Figure 56 : Hydrogénolyse du mPEG-diol protégé.**

L'étape suivante est une étape clé dans cette stratégie de synthèse, elle consiste à protéger sélectivement un seul groupement hydroxyle du mPEG-diol. Le deuxième groupement hydroxyle libre sera utilisé ultérieurement pour amorcer la polymérisation par ouverture de cycle du *rac*-lactide.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord testé la monoprotection sous forme d'éthers silylés. Avant de travailler sur la chaîne de mPEG, nous avons fait des tests sur un modèle de diol moléculaire pour identifier l'agent de protection le plus sélectif (Figure 57).

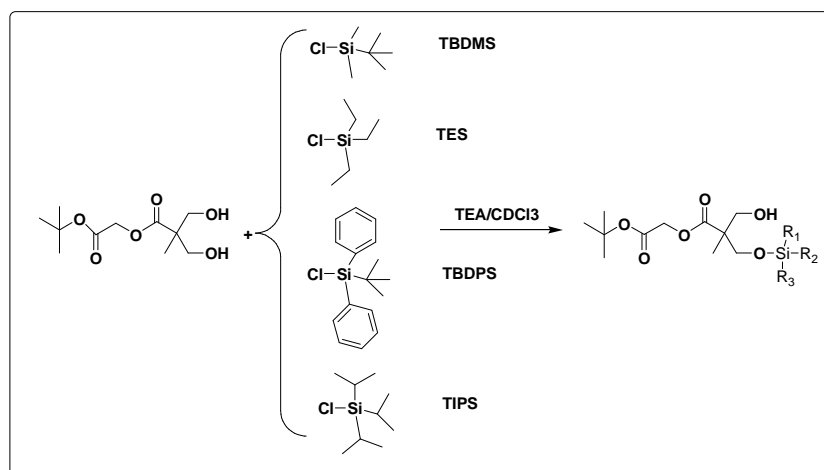


Figure 57 : Réactions de monoprotection d'un diol moléculaire (modèle).

Nous avons étudié quatre types de chlorosilanes avec des substituants plus ou moins encombrés (Figure 57). Les deux chlorosilanes les moins encombrés [*tert*-butyldiméthylchlorosilane (TBDMS) et *tri*-éthylchlorosilane (TES)] offrent quantitativement le produit de disilylation. Tandis qu'avec les deux chlorosilanes les plus encombrés [*tert*-butyldiphénylchlorosilane (TBDPS) et *tris*-isopropylchlorosilane (TIPS)], le produit de monosilylation est obtenu sélectivement. Il est à noter que la réactivité du TIPS est bien meilleure en comparaison à celle du TBDPS (conversion complète en 6 h pour le TIPS vs 24 h pour le TBDPS).

Cette protection sélective est suivie par RMN <sup>1</sup>H (Figure 58) et par spectroscopie de masse. Avec le TIPS, La monosilylation est confirmée par spectroscopie de masse (MNH<sub>4</sub><sup>+</sup> mesuré = 422.2 g/mol, calculé 422.64 g/mol). De plus, en RMN <sup>1</sup>H, le singulet (B) des méthylènes en alpha des hydroxyles se transforme en doublets dédoublés après monoprotection. En effet, Le carbone quaternaire en position bêta de l'éther silylé devient asymétrique, ce qui rend les deux protons en alpha de l'éther silylé (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>) et les deux protons en alpha de l'hydroxyle (H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub>) diastéréotopiques. Nous observons ainsi deux doublets dédoublés (dont deux sont superposés). Les deux protons en alpha de l'ester (H<sub>c</sub>, H<sub>d</sub>) deviennent également diastéréotopiques. Toutes ces observations confirment bien la protection sélective d'un seul hydroxyle. En revanche, avec le TBDMS comme agent de protection, le même singulet (A) se dédouble en deux signaux distincts à 4.47 ppm (doublé dédoublé) et 4.50 ppm (singulet), indiquant la présence de deux produits : monosilylé et disilylé. Par spectroscopie de masse, le disilylé a été détecté à MNH<sub>4</sub><sup>+</sup> mesuré = 494.2 g/mol (calculé = 494.33 g/mol).

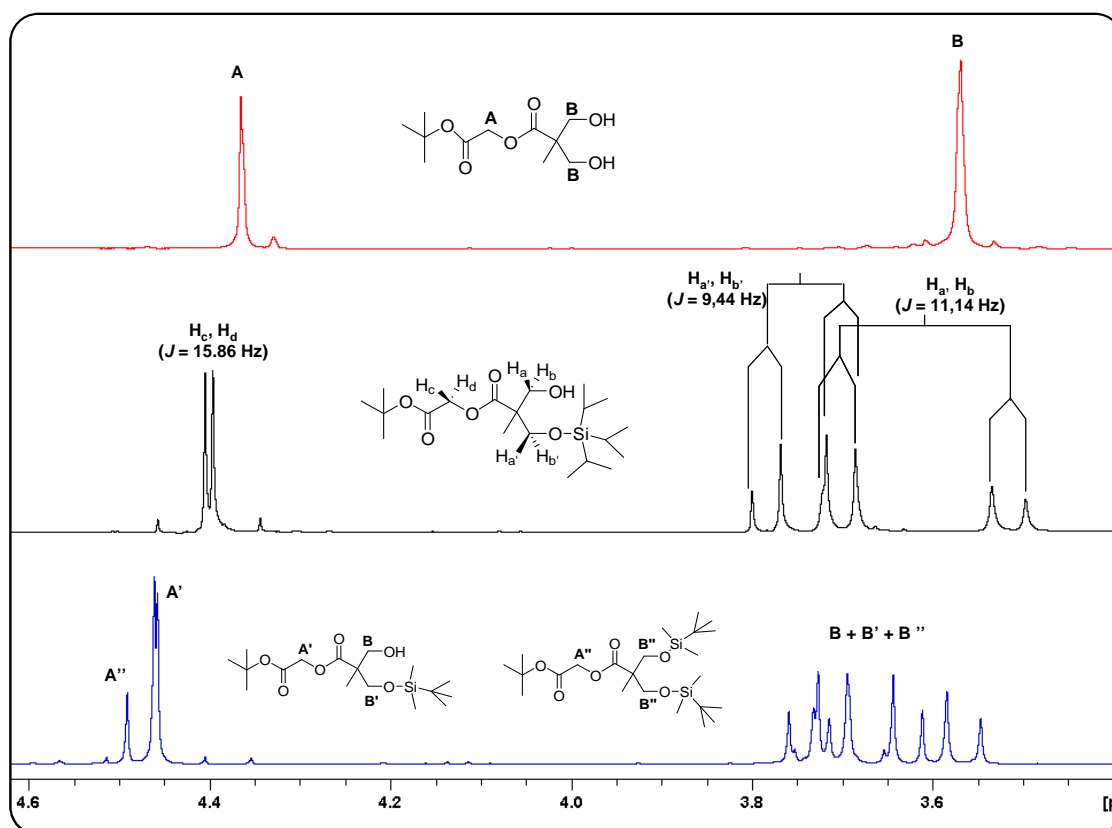


Figure 58 : Caractérisation par RMN  $^1\text{H}$  de la silylation du modèle moléculaire (300 MHz).

Le choix de TIPS semble être intéressant. Il est plus réactif que TBDPS et selon la littérature, moins stable vis-à-vis l'hydrolyse acide.<sup>[14]</sup> Nous pourrions donc déprotéger l'hydroxyle plus facilement.

Ces résultats de silylation mettant en jeu un diol moléculaire nous ont encouragés à explorer le TBDPS et le TIPS pour la monoprotection du mPEG-diol. La réaction a été suivie par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Le triplet correspondant au méthylène terminal du mPEG-diol ( $-\text{CH}_2\text{-OCOR}$ , 4.33 ppm, 2H) se blinde vers 4.26 ppm (Figure 59). Le dédoublement des protons en alpha de l'éther silylé et de l'hydroxyle est également observé avec la chaîne de PEG à cause de la dissymétrisation du carbone quaternaire voisin (protons diastéréotopiques). Ces analyses RMN confirment bien l'obtention d'une monoprotection sélective avec les deux groupements portant les substituants les plus encombrés. En revanche, dans le cas des agents de protection les moins encombrés (TBDMS et TES), il y a coexistence de deux déplacements chimiques en  $^1\text{H}$  à 4.26 ppm (monoprotection) et 4.19 ppm (diprotection).

Les résultats quantitatifs de ces tests de protection sont récapitulés dans le Tableau 1. Ces résultats confirment bien les tests conduits sur le modèle moléculaire.

	<i>Tert</i> -BuMe <sub>2</sub> SiCl (1 eq.)	Et <sub>3</sub> SiCl (1 eq.)	<i>Tris</i> -iPrSiCl (2 eq.)	<i>Tert</i> -BuPh <sub>2</sub> SiCl (2 eq.)
Sélectivité (Diprotection/Monoprotection)	35/30	25/50	0/100	0/100

A la différence de ce qui a été observé à l'échelle moléculaire, la monoprotection du mPEG-diol est bien plus lente (de 24 h jusqu'à 72 h) et surtout pour une échelle de synthèse de 10 – 20 g. Pour accélérer cette synthèse, nous avons été amené à utiliser un large excès de chlorosilane (allant jusqu'à 8 équivalents). Notons qu'à l'échelle macromoléculaire, la conversion du mPEG-diol en mPEG-OH monoprotégé est une étape très importante étant donné que la séparation des produits non convertis est impossible. La réaction a donc été systématiquement suivie par RMN  $^1\text{H}$  pour quantifier le taux de mPEG-diol résiduel. Pour assurer une quantification précise du taux de protection, la réaction a été suivie par RMN à haut champ (500 MHz), ce qui nous a permis de quantifier après quelques heures de réaction environ 10% de mPEG-diol non protégé (Figure 59) (cette proportion de mPEG-diol n'était

pas détectable avec un champ de 300 MHz). L'analyse du produit fini à haut champ nous a donc permis de vérifier l'absence de mPEG-diol résiduel.

L'analyse RMN  $^{13}\text{C}$  a permis également de confirmer la protection sélective d'un seul hydroxyle. Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , le pic des deux carbones en alpha des groupements hydroxyles (67.1 ppm) se dédouble ainsi en deux pics distincts [(IV) :  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  à 65.6 ppm et  $-\text{CH}_2\text{-OSi}^i\text{BuPh}_2$  à 66.4 ppm ; (IV') :  $-\text{CH}_2\text{-OH}$  à 66.1 ppm -  $-\text{CH}_2\text{-OSi}^i\text{Pr}_3$  à 66.8 ppm] (Figure 60).

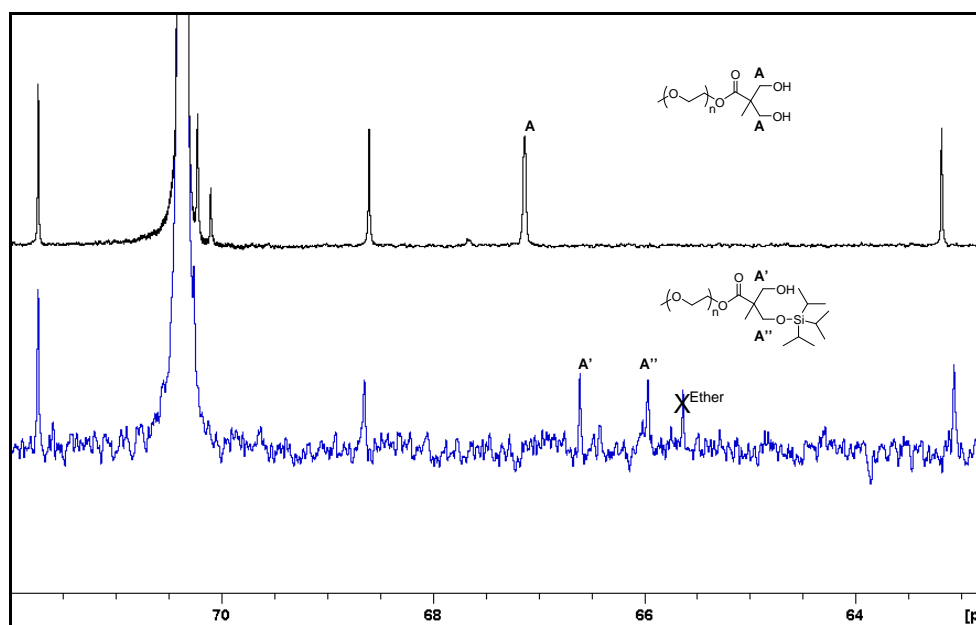


Figure 60 : Caractérisation de la monosilylation du mPEG-diol par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$ .

Les synthèses ont porté sur une échelle de quelques grammes (environ 15 g). Les produits sont purifiés par précipitation dans l' $\text{Et}_2\text{O}$ . En plus de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , le mPEG monosilylé a été caractérisé par chromatographie d'exclusion stérique (SEC), indiquant une seule population avec  $M_n = 2100$  g/mol et  $\text{PDI} = 1.09$ . De plus, la présence d'une seule population et la nature du groupement terminal correspondant au produit désiré a été vérifiée par MALDI-TOF (Figure 61).

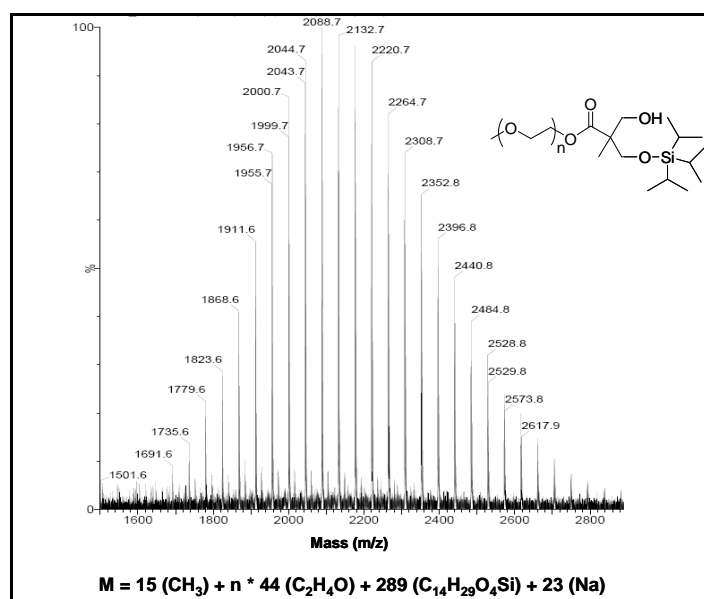


Figure 61 : MALDI-TOF du macroamorceur mPEG-OTIPS-OH (IV').

Après avoir synthétisé et isolé le mPEG fonctionnalisé, ce dernier a été utilisé par la suite comme macroamorceur pour la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du lactide. La stratégie envisagée pour conduire cette polymérisation met en jeu l'utilisation de catalyseurs organiques. En effet, l'utilisation de tels systèmes catalytiques organiques permettrait d'éviter les problèmes de toxicité liés aux métaux. De plus, plusieurs catalyseurs organiques permettent de préparer des chaînes de PLA de manière bien contrôlée et dans des conditions douces, en comparaison avec les catalyseurs métalliques.

### III. Synthèse des copolymères mPEG-PLA

#### 1. Etat de l'art sur la ROP du lactide

Deux grandes stratégies ont été développées pour préparer des PLAs: (i) la polycondensation de l'acide lactique, et (ii) la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du lactide cyclique correspondant, un concept introduit en 1932 par W. Carothers.<sup>[15]</sup> La polycondensation de l'acide lactique conduit à un contrôle modéré de la structure polymérique, l'équilibre thermodynamique de la réaction étant déplacé par la distillation de l'eau résultante. Contrairement à cette stratégie, la ROP permet d'obtenir un meilleur contrôle de la polymérisation, notamment sur les masses molaires, sur la polydispersité et sur la microstructure du polymère. Des systèmes catalytiques variés et de plus en plus efficaces ont été développés dans le but de préparer des PLAs bien définis grâce à la ROP du lactide.

### a. De la catalyse métallique à la catalyse organique

Les catalyseurs métalliques simples à base d'étain, d'aluminium et de zinc ont été les premiers systèmes développés, et sont encore aujourd'hui les plus utilisés pour la ROP (Figure 62).<sup>[16]</sup>

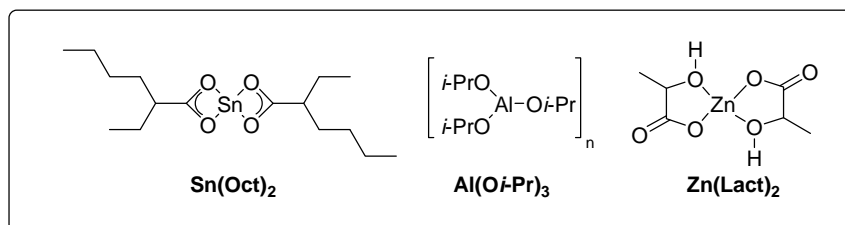


Figure 62 : Structure de quelques catalyseurs métalliques.

$\text{Sn}(\text{Oct})_2$  est le catalyseur le plus utilisé industriellement. Il est commercial, facilement manipulable, robuste et soluble dans des solvants communs et dans des monomères fondus. La réaction de polymérisation avec  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  est généralement conduite en présence d'un alcool comme co-amorceur. Ce système permet de préparer de hautes masses molaires ( $>10^5$ - $10^6$  g/mol) en quelques minutes à quelques heures (en masse à 140-180 °C).<sup>[17]</sup>

Les nombreuses données expérimentales et théoriques démontrent que la polymérisation se fait par un mécanisme de coordination-insertion en trois étapes avec ces systèmes métalliques (Figure 63).<sup>[18-21]</sup> Une fois la totalité du monomère consommée, la liaison métal-alkoxy (M-O) est hydrolysée pour permettre la libération de l'alcool terminal.

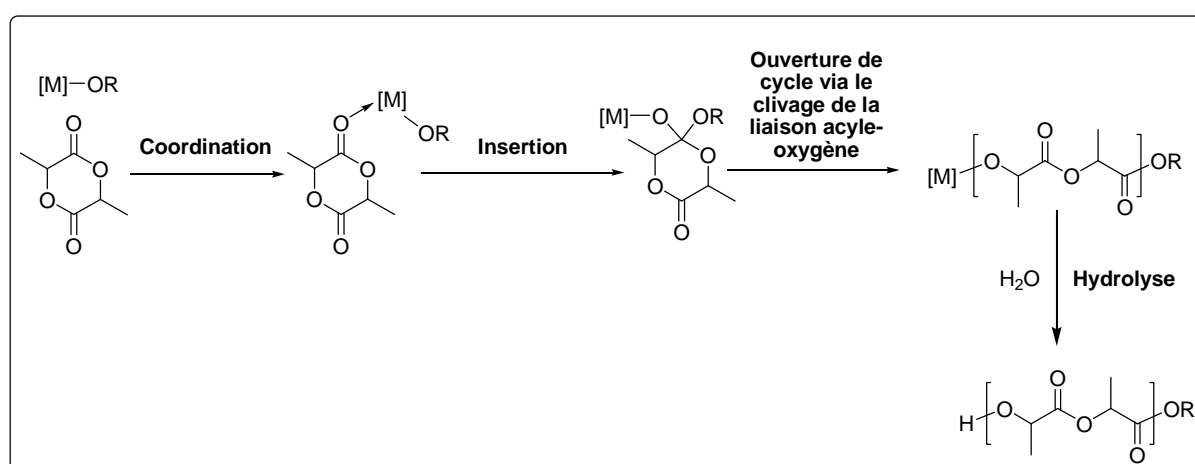
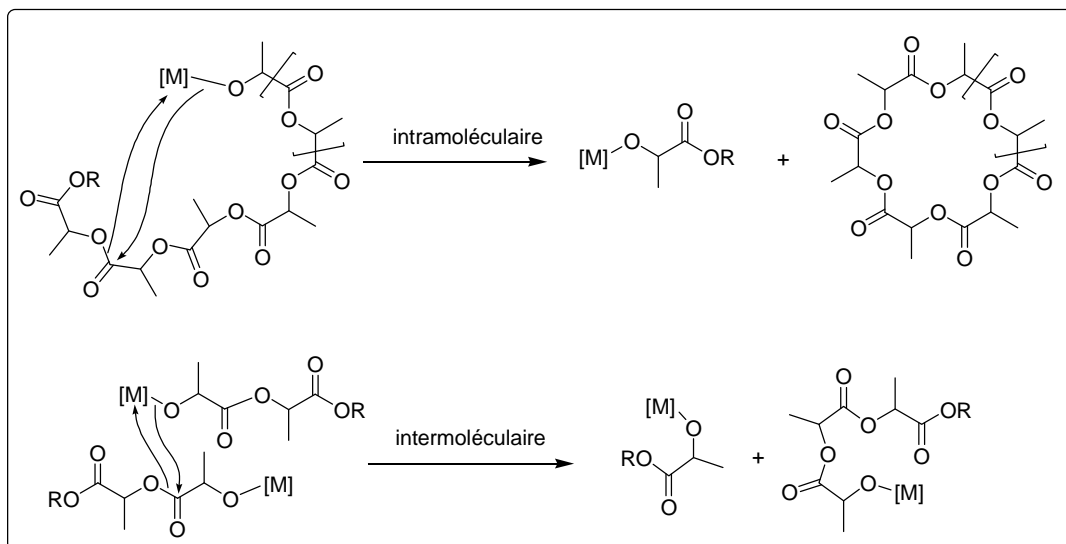


Figure 63 : Mécanisme de coordination-insertion (ROP de lactide).

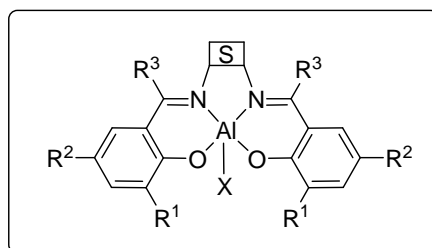
Ces systèmes catalytiques métalliques sont souvent accompagnés de réactions secondaires. Les plus importantes sont les réactions de transestérification qui peuvent être soit

intermoléculaires soit intramoléculaires sont très importantes (Figure 64).<sup>[22]</sup> Ces réactions de transestérification limitent le contrôle de la réaction de ROP en élargissant la distribution de masse ( $M_w/M_n > 1.3$ ) des polymères et en générant des macrocycles (transestérification intramoléculaire).



**Figure 64 : Réactions secondaires de transestérification intra- et intermoléculaire.**

Afin de limiter ces problèmes, de nouveaux catalyseurs métalliques plus performants ont été développées. Ces catalyseurs sont de type  $L_nMX$ , où M est le centre métallique actif, X le groupe amorceur (généralement un alkoxyde), et  $L_n$  des ligands encombrés. Ces derniers minimisent généralement l'agrégation et les réactions secondaires, et permettent donc l'obtention de PLA de manière bien contrôlée. A titre d'exemple, plusieurs études ont été menées sur des complexes d'aluminium dérivés des ligands SALEN (Figure 65). Ce type de complexes montre une activité modérée, mais les polymérisations sont bien contrôlées ( $M_w/M_n < 1.2$ ).<sup>[23-26]</sup>



**Figure 65 : Structure générale des complexes d'aluminium portant des ligands SALEN (S = espaceur).**

Dans un second temps, les catalyseurs non-métalliques ont suscité un intérêt de plus en plus croissant pour des raisons économiques et environnementales. Dans cette optique, des

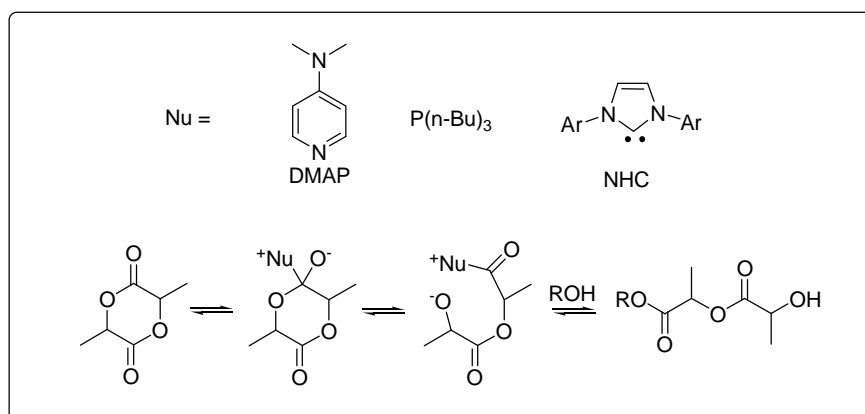


enzymes (ex. lipases) et des organocatalyseurs (ex. amines, NHC, phosphines) ont été explorés pour des réactions d'estérification,<sup>[27-33]</sup> et pour la ROP du lactide.<sup>[34-38]</sup> Ces systèmes catalytiques sans métal sont particulièrement attractifs pour les applications biomédicales, puisque la contamination métallique, qui pourrait être toxique à faible dose, est évitée.

Depuis une dizaine d'années, de nombreux catalyseurs organiques ont été évalués en polymérisation par ouverture de cycle. Ces catalyseurs peuvent être classés en fonction de leur mode d'activation : basique, nucléophile, acide et bifonctionnel.

### *b. Catalyseurs Nucléophiles/Basiques*

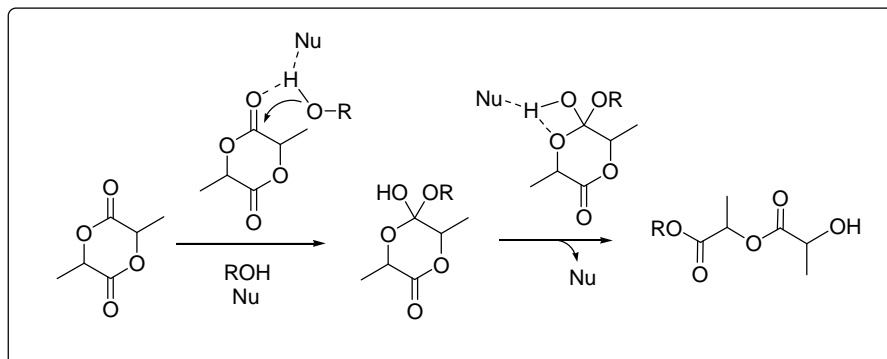
Dans cette approche, les amines, les carbènes N-hétérocycliques (NHC) et les phosphines ont montré une bonne activité pour la ROP du lactide en présence d'un amorceur protique (ROH). Le mécanisme de cette activation n'est pas encore bien connu. Il semble qu'il s'agit d'une activation nucléophile du monomère uniquement, mettant en jeu un complexe intermédiaire lactide-nucléophile (Figure 66).<sup>[37]</sup>



**Figure 66 : Mécanisme proposé pour la ROP activée par catalyse nucléophile.**

L'amorceur protique (ROH) réagirait ensuite avec ce complexe lactide-nucléophile pour ouvrir le cycle et libérer le nucléophile. La propagation de chaîne est ensuite assurée par réaction de l' $\omega$ -hydroxyle secondaire (généralisé lors de l'étape précédente) avec un monomère activé. Le mécanisme proposé est compatible avec la nature de l'extrémité de chaîne  $\alpha$  du PLA obtenu, ester ou acide en fonction de l'amorceur protique utilisé (alcool ou H<sub>2</sub>O, respectivement).

L'activation pourrait également se faire selon un mécanisme basique (Figure 67). Selon des calculs DFT, ce mécanisme est favorisé dans le cas des réactions de transestérification catalysées par des NHC.<sup>[39]</sup> Il a été mis en évidence également pour la DMAP.<sup>[40]</sup>



**Figure 67 : Mécanisme proposé pour la ROP par catalyse basique.**

Les premiers organocatalyseurs utilisés en catalyse nucléophile/basique pour la polymérisation du lactide sont les pyridines [ex. DMAP et la 4-(1-pyrrolidinyl)-pyridine (PPY)]. Ces catalyseurs ont montré une activité élevée pour la ROP du lactide.<sup>[37]</sup> De hautes masses molaires ( $M_n \sim 20000$  g/mol) ont été obtenues que ce soit en masse à 135 °C en quelques minutes ou dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $[\text{LA}]_0 \sim 1.4$  M) à 35 °C en quelques jours. Contrairement à ce qui est observé avec des catalyseurs métalliques, des temps de réaction prolongés n'ont aucun effet sur la masse moléculaire des polymères.

Ces résultats préliminaires ont motivé ensuite l'exploration d'autres nucléophiles comme organocatalyseurs pour la ROP du lactide, tels que les NHCs. En effet, Hedrick et Waymouth ont utilisé le carbène 1,3-bis-(2,4,6-triméthylphényl)-imidazol-2-ylidène (IMes) (Figure 68) pour la ROP du lactide. De hautes masses molaires ( $M_n \sim 30000$  g/mol) dans le THF sont obtenues en moins d'une heure à température ambiante de manière contrôlée ( $M_w/M_n < 1.15$ ).<sup>[34]</sup> Ce carbène est bien plus actif que les pyridines et les phosphines.

Il est à noter que le rapport catalyseur/amorceur a une grande influence dans le contrôle de la polymérisation. A titre d'exemple, des rapports entre 0.25 et 1.5 permettent l'obtention de hautes masses ( $\text{DP} > 100$ ) avec de faibles indices de polymolécularité (IP). Alors qu'avec un ratio beaucoup plus faible de l'ordre de 0.0125, seulement des oligomères ( $\text{DP} = 15$ ) avec un faible IP sont obtenus.

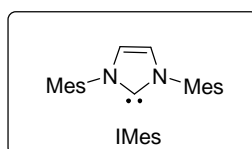
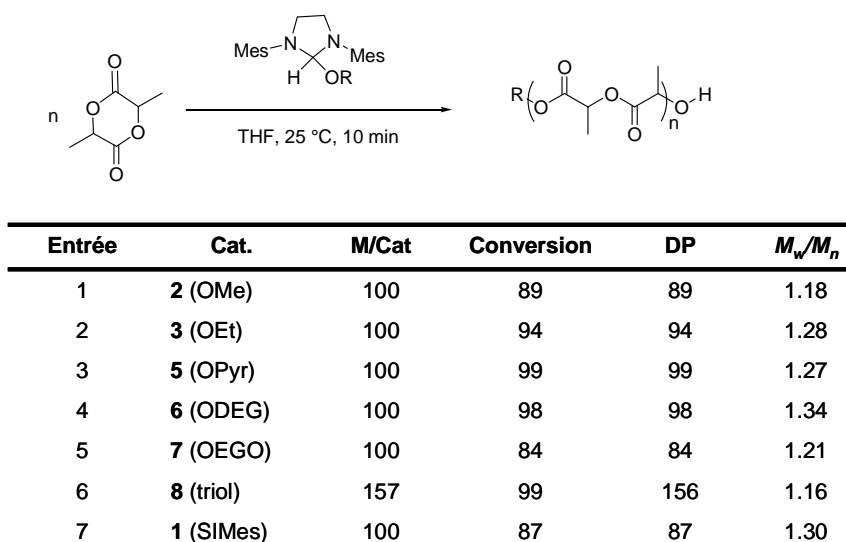


Figure 68 : Structures du NHC IMes.

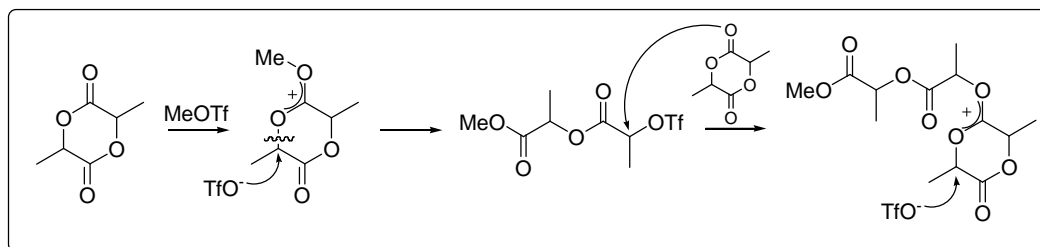
Pour répondre à la très haute sensibilité à l'air et à l'humidité des NHCs, des adduits stables de NHC permettant de générer *in situ* l'espèce active ont été développés. A titre d'exemple, un adduit carbène/alcool peut agir comme un système « tout-en-un » catalyseur/amorceur.<sup>[41;42]</sup> En effet, les adduits d'alcools primaire et secondaire de l'imidazolin-2-ylidène sont stables et se dissocient réversiblement en solution à température ambiante. Dans ces conditions, 100 éq. de lactide sont polymérisés en moins de 15 minutes, avec des masses contrôlées (Figure 69).<sup>[41]</sup> Il est également possible de synthétiser des architectures variées (ex. terpolymères), en jouant sur la structure de l'amorceur.

Figure 69 : Exemple de ROP du lactide avec des adduits alcool/carbène.<sup>[41]</sup>

### c. Catalyse cationique

La ROP cationique du lactide a été d'abord décrite par Kricheldorf *et al.* dans les années 1980. Seules l'acide trifluorométhanesulfonique (HOTf) et le trifluorométhanesulfonate de méthyle (MeOTf) permettaient la ROP du lactide en 48 h à 50 °C dans le nitrobenzène. L'activité était bien meilleure dans ce dernier solvant que dans un solvant chloré.<sup>[43;44]</sup> L'extrémité de chaîne du polymère obtenu à l'aide de MeOTf comme amorceur est un ester de méthyle selon la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H. Ce résultat suggère que la polymérisation se fait par coupure de la liaison alkyle-oxygène plutôt que par coupure de la liaison acyle-oxygène. Les auteurs ont

proposé un mécanisme avec une activation cationique du monomère (Figure 70). Cependant, la variation du ratio monomère/amorceur entre 50 et 400 n'a pas d'effet remarquable sur la viscosité des polymères obtenus, ce qui indique que la polymérisation cationique est loin d'être contrôlée dans ces conditions.

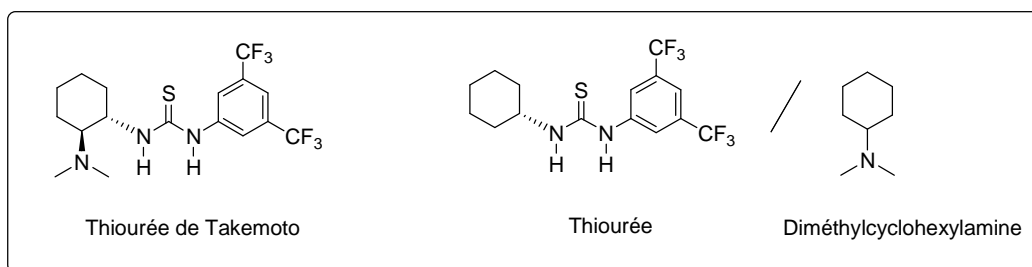


**Figure 70 : Mécanisme proposé pour la ROP acide du lactide.**

Dans les années 2000, Endo et Jérôme ont mis en évidence la polymérisation de l' $\epsilon$ -caprolactone et de la  $\delta$ -valérolactone en combinant un acide ( $\text{HCl} \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) et un amorceur protique ROH (alcool ou  $\text{H}_2\text{O}$ ).<sup>[45;46]</sup> Ce système catalytique a permis l'obtention de polymères dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à 0 °C, en quelques heures avec des masses entre 3000 et 14000 g/mol et de faibles indices de polymolécularité (IP) ( $M_w/M_n < 1.25$ ). Ce système a été ensuite développé dans notre équipe pour la ROP du lactide, en combinant HOTf avec un alcool comme amorceur protique.<sup>[47;48]</sup> La polymérisation se déroule de manière contrôlée en quelques heures. Lorsque l'amorceur protique est un alcool (pentanol ou iso-propanol), des polymères avec une extrémité ester sont obtenus (dans le cas de l'eau, une extrémité acide carboxylique est obtenue). Ce résultat suggère une coupure de la liaison acyle-oxygène.<sup>[48]</sup>

#### *d. Organocatalyse Bifonctionnelle*

Les urées et les thiourées ont été largement étudiées comme organocatalyseurs pour de nombreuses synthèses organiques, l'activation du substrat organique se faisant par des liaisons hydrogène avec le catalyseur.<sup>[49]</sup> Ces résultats spectaculaires ont incité Hedrick et Waymouth à explorer le catalyseur de Takemoto<sup>[50]</sup> thiourée-amine comme un catalyseur bifonctionnel pour la ROP du lactide (Figure 71).<sup>[51]</sup> Ce catalyseur combine une fonction thiourée et une fonction amine tertiaire, au sein de la même molécule. Quelques exemples de ROP avec ce système sont décrits dans le Tableau 2.



**Figure 71 : Structures des catalyseurs thiourée-amine, thiourée et amine.**

En utilisant le 4-pyrènebutanol comme amorceur, une conversion du lactide d'environ 97% a été atteinte au bout de 48 h, à température ambiante dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, pour un ratio [LA]<sub>0</sub>/[I]<sub>0</sub>/Cat = 100/1/5 (Tableau 2). Le caractère vivant et l'efficacité de l'initiation ont été établis par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H et analyses SEC et prouvés par une expérience d'extension de chaîne. Le catalyseur de Takemoto s'est avéré très sélectif en faveur de la polymérisation par rapport à la transestérification. En effet, les polymères obtenus présentent un très faible indice de polymolécularité ( $M_w/M_n < 1.08$ ), même après des temps de réaction prolongés.

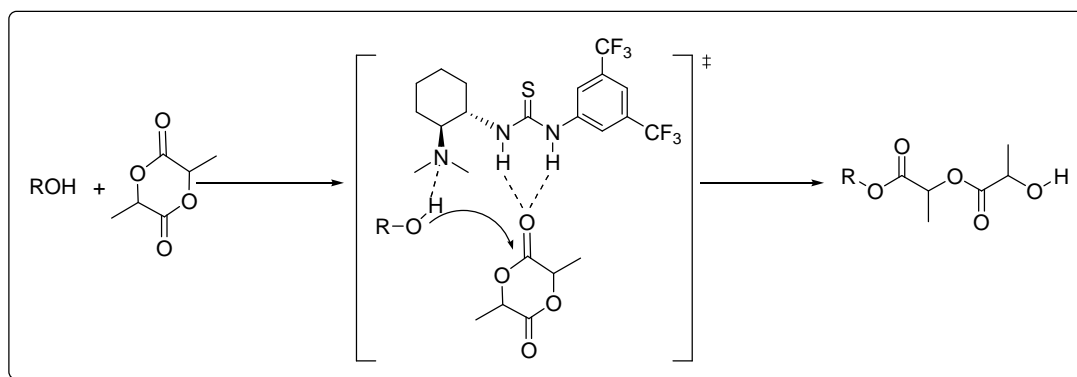
[M]/[I]	Temps <sup>a</sup> (h)	Conversion % <sup>b</sup>	DP <sup>b,c</sup>	$M_n$ SEC <sup>d</sup> (g/mol)	$M_w/M_n$ <sup>d</sup>
20	24	97	21	5200	1.08
50	32	98	53	12300	1.05
100	48	97	103	23000	1.05
200	105	98	215	42000	1.05
500	144	95	e	e	e

4-pyrènebutanol comme amorceur. <sup>a</sup> 5 mol % de Thiourée de Takemoto; [LA] = 1 M dans DCM.

<sup>b</sup> Déterminée par RMN <sup>1</sup>H. <sup>c</sup> Degré de polymérisation. <sup>d</sup> Déterminée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). <sup>e</sup> insoluble dans le THF.

**Tableau 2 : Propriétés des PLA obtenus par ROP à l'aide de la thiourée de Takemoto.**<sup>[51]</sup>

Par analogie avec le mécanisme proposé par Berkessel *et al.* pour la résolution cinétique dynamique d'azolactones,<sup>[52;53]</sup> une activation bifonctionnelle a été postulée pour cette ROP. La thiourée active donc le groupement carbonyle du monomère par liaisons hydrogène, pendant que l'amine tertiaire basique active l'alcool amorçant ou propageant pour l'attaque nucléophile (Figure 72).



**Figure 72 : Mode d'action du catalyseur bifonctionnel de Takemoto pour la ROP du lactide.**

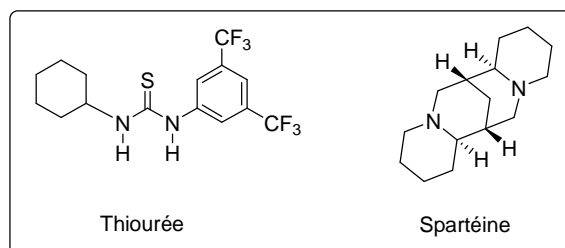
Le caractère bifonctionnel du système catalytique s'est avéré critique. En utilisant dans les mêmes conditions la thiourée ou l'amine seule, il n'y a pas de polymérisation. Le rôle important des liaisons hydrogène est également déduit à partir de la grande dépendance au solvant : la polymérisation est inhibée dans des solvants coordinants, tels que le THF et le DMF.

Malgré le bon résultat de ROP obtenu grâce à ce catalyseur, sa réactivité reste bien inférieure à celle observée avec les NHCs (temps de réaction d'environ 48-72 h vs quelques minutes). Dans le but d'optimiser ce système catalytique bifonctionnel, la structure du catalyseur a été modifiée. Dans un premier temps, la longueur de la chaîne entre les fonctions amine et thiourée a été modulée (C1, C2 et C3).<sup>[54]</sup> Il s'est avéré qu'en augmentant l'espace entre ces deux fonctions, l'activité diminuait. Ce résultat peut être expliqué par l'augmentation de la flexibilité de l'espaceur alkyle, ce qui favorise l'interaction intramoléculaire entre la fonction amine basique et la fonction thiourée, provoquant ainsi la désactivation du système catalytique.

Dans un second temps, Hedrick et Waymouth.<sup>[54]</sup> ont exploré un système bimoléculaire thiourée/amine. Il s'est avéré que la thiourée-amine de Takemoto et la thiourée associée à la diméthylcyclohexylamine présentaient la même activité. Ils ont ensuite fait varier les structures de l'amine et de la thiourée pour étudier l'influence sur l'activité. De meilleures activités sont obtenues en optimisant les effets stériques et électroniques de la thiourée. Différentes substitutions au niveau du groupement aryle ont été étudiées (CF<sub>3</sub>, Cl, Me, OMe en position *para*, et deux CF<sub>3</sub> en position *méta*). Les groupes électroattracteurs (type CF<sub>3</sub>) donnent les meilleures activités (au bout de 72 h de réaction, 98% de conversion a été atteinte en utilisant deux substituants CF<sub>3</sub> en position *méta*, 44% de conversion avec un groupement CF<sub>3</sub> en position *para* et seulement 17 % de conversion avec un groupement méthyle ou

méthoxy en position *para*). Cette substitution permet en effet d'augmenter l'acidité des protons de la fonction thiourée. Le remplacement du cyclohexyle par un autre aryle n'améliore pas l'activité du catalyseur, mais montre plutôt que l'encombrement stérique à ce niveau diminue l'activité.

En ce qui concerne l'amine tertiaire basique, les auteurs ont testé différentes amines et diamines, la meilleure activité a été obtenue avec la spartéine (Figure 73).<sup>[54]</sup> Ce couple de catalyseur (thiourée/spartéine) permet de réduire significativement le temps de réaction (jusqu'à 25 fois), avec un faible taux de charge. A titre d'exemple, avec un ratio  $[LA]_0/[I]_0/\text{Thiourée}/\text{Spartéine} = 100/1/2.5/1.5$ , une conversion complète du monomère est observée au bout de 2 h à température ambiante ( $[LA]_0 = 2.8 \text{ M}$ ). La ROP est bien contrôlée, permettant d'obtenir des polymères avec un faible indice de polymolécularité ( $M_w/M_n \sim 1.05$ ).



**Figure 73 : Système Catalytique bifonctionnel le plus actif pour la ROP du lactide.**

L'efficacité et la tolérance vis-à-vis de différents groupes fonctionnels d'un tel système catalytique ont été confirmées par la préparation de PLA avec différentes extrémités (thiol, silanol, ou amine primaire comme amorceur).<sup>[54]</sup> Il est également possible de préparer différents copolymères à blocs (PEG-PLA, PS-PLA, PVP-PLA, PMMA-PLA...).<sup>[4;54]</sup>

L'amélioration de la ROP du lactide en utilisant la spartéine comme amine tertiaire très basique peut être extrapolée à l'utilisation d'autres bases plus fortes (super-bases). Parmi ces bases, nous pouvons citer les guanidines 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène (TBD) et *N*-méthyl-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ène (MTBD) et l'amidine 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ène (DBU). Ces catalyseurs ont été utilisés auparavant dans de nombreuses réactions chimiques, incluant les transestérifications.<sup>[55;56]</sup> Elles présentent une telle basicité qu'elles peuvent polymériser le lactide sans la thiourée. En effet, une conversion complète est atteinte beaucoup plus vite que dans le cas de thiourée/spartéine (quelques minutes *vs* 2 h). La TBD seule permet également la polymérisation d'autres esters cycliques tels que la  $\gamma$ -valérolactone et l' $\epsilon$ -caprolactone. Alors que la DBU et le MTBD peuvent polymériser ces monomères

uniquement en présence de thiourée.<sup>[57]</sup> Dans le cas du lactide, pour un ratio  $[LA]_0/[I]_0/TBD = 500/1/0.5$  et  $[LA]_0 = 1$  M, une polymérisation complète est atteinte en seulement 1 minute à température ambiante dans le DCM. La distribution de la masse moléculaire du polymère obtenu est étroite ( $1.11 < M_w/M_n < 1.19$ ), mais s'élargit si le temps de réaction est prolongé. Afin d'éviter ce problème, il est possible de neutraliser le catalyseur en ajoutant de l'acide benzoïque en fin de réaction.

Les catalyseurs thiourée/amine et guanidines sont sans doute les systèmes catalytiques organiques les plus efficaces pour la préparation de PLA, en termes d'activité et de contrôle de la polymérisation. Mais, le couple thiourée/spartéine est largement préféré pour la ROP du lactide. Il permet en effet d'obtenir un meilleur contrôle de la polymérisation dans des conditions douces même avec un temps de réaction prolongé.

## 2. Synthèse des copolymères mPEG-PLA avec le système thiourée/spartéine

Dans la littérature, très peu d'exemples ont été décrits concernant l'utilisation d'organocatalyseurs pour préparer des copolymères de PEG-PLA destinés à la vectorisation des taxanes (exclusivement pour une encapsulation physique).<sup>[4]</sup> A notre connaissance, notre projet est le premier cas d'étude où ce type de catalyseur est utilisé pour la préparation de nanoconjugués de structures linéaires et Y, permettant ainsi d'obtenir des nanoparticules avec une encapsulation covalente. De plus, comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre I, les quelques exemples de conjugués linéaires de PEG-PLA-PA décrits dans la littérature, où la ROP se fait en présence d'octanoate d'étain, souffrent d'un degré de caractérisation faible et dans la majorité des cas d'un couplage inférieur à 70 %.<sup>[58;59]</sup> Il est donc très important de vérifier que notre méthodologie est compatible avec un degré d'exigence élevé en terme de caractérisation afin d'atteindre 100 % d'efficacité de couplage.

Comme cela a été détaillé dans le paragraphe précédent, le couple de catalyseurs thiourée/spartéine donne la meilleure activité pour la ROP du lactide, avec une conversion complète du monomère au bout de quelques heures de réaction à température ambiante, avec un faible taux de catalyseur (1.5-2.5 mol %). De plus, l'efficacité et la tolérance du groupement fonctionnel du catalyseur thiourée/amine ont permis de préparer des PLA avec des amorceurs variés, ainsi que des copolymères à blocs. En effet, le copolymère à blocs linéaire PEG-PLA a été préparé par Hedrick *et al.* en utilisant le mPEG-OH (5000 g/mol) comme macroamorceur, en présence de 10 mol % de thiourée et de 5 mol % de (-)-



spartéine.<sup>[54]</sup> Une conversion complète du lactide (DP 70) est atteinte au bout de 2h30 de réaction, le copolymère obtenu présente un faible indice de polymolécularité ( $M_w/M_n = 1.05$ ). L'utilisation de macroamorceur, tel que le mPEG-OH, ne semble donc influencer ni l'efficacité du système catalytique ni le caractère contrôlé de cette ROP. Ce système est donc très intéressant pour accéder à des architectures macromoléculaires variées en jouant sur la nature et la structure de l'amorceur.

Nous avons donc choisi de préparer nos différents copolymères mPEG-PLA (linéaires et Y) à l'aide de ce couple de catalyseurs thiourée/spartéine, dans le but d'obtenir des structures macromoléculaires de façon bien contrôlée en termes d'incorporation du macroamorceur, de conversion, d'extrémité de chaîne et de polydispersité. La thiourée a été synthétisée selon le protocole décrit dans la littérature.<sup>[54]</sup>

### Synthèse du copolymère mPEG-PLA linéaire

Nous avons tout d'abord commencé par évaluer l'activité du système catalytique thiourée/spartéine avec différents amorceurs (moléculaires et macromoléculaires). La polymérisation est effectuée à 35 °C, dans le dichlorométhane en présence de l'amorceur (ROH), le D,L-lactide (DP = 100,  $[LA]_0 = 1M$ ), 4 mol % de thiourée et 2 mol % de spartéine. Tous les réactifs et solvants sont séchés et purifiés selon les modes opératoires décrits dans la partie expérimentale. Pour cette étude préliminaire, nous avons utilisé le pentanol comme amorceur moléculaire, ensuite le mPEG<sub>2000</sub>-OH linéaire comme macroamorceur (Tableau 3).

Entrée	ROH	$[LA]_0/[ROH]$	Temps (h)	Conversion %	$M_n(th)^b$ (g/mol)	$M_n(SEC)^c$ (g/mol)	$M_w/M_n^c$
1	n-PentOH	100	0.5	98	14200	14550	1.11
2	mPEG <sub>2000</sub> -OH	100	1	98	16112	16500	1.10

Polymérisation de D,L-Lactide (Concentration  $[LA]_0$  : 1M dans DCM), à 35 °C, avec 4 mol% de Thiourée et 2 mol% de Spartéine.

<sup>a</sup> Conversion : obtenu par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H.

<sup>b</sup>  $M_n(th)$  : calculé à partir de la masse molaire du lactide \*  $[LA]_0/[ROH]$  \* Conversion + la masse molaire de l'amorceur ROH.

<sup>c</sup>  $M_n(SEC)$  et  $M_w/M_n$  : obtenus à partir de la SEC (dans le THF), en utilisant des standards de polystyrène.

**Tableau 3 : Polymérisation du D,L-Lactide avec le système Thiourée/Spartéine.**

L'avancement de la ROP est suivi par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H grâce au taux de conversion du monomère (Figure 74). A conversion complète, le système catalytique est neutralisé avec de l'acide benzoïque. Le DP du lactide au sein du copolymère est déterminé en intégrant le multiplet à 5.16 ppm correspondant aux  $-CH_2-$  de la chaîne de PLA, la calibration du spectre RMN <sup>1</sup>H se fait à l'aide du  $MeO-$  appartenant à la chaîne de mPEG (s, 3H, 3.37 ppm). Cette intégration correspond au double du DP recherché.

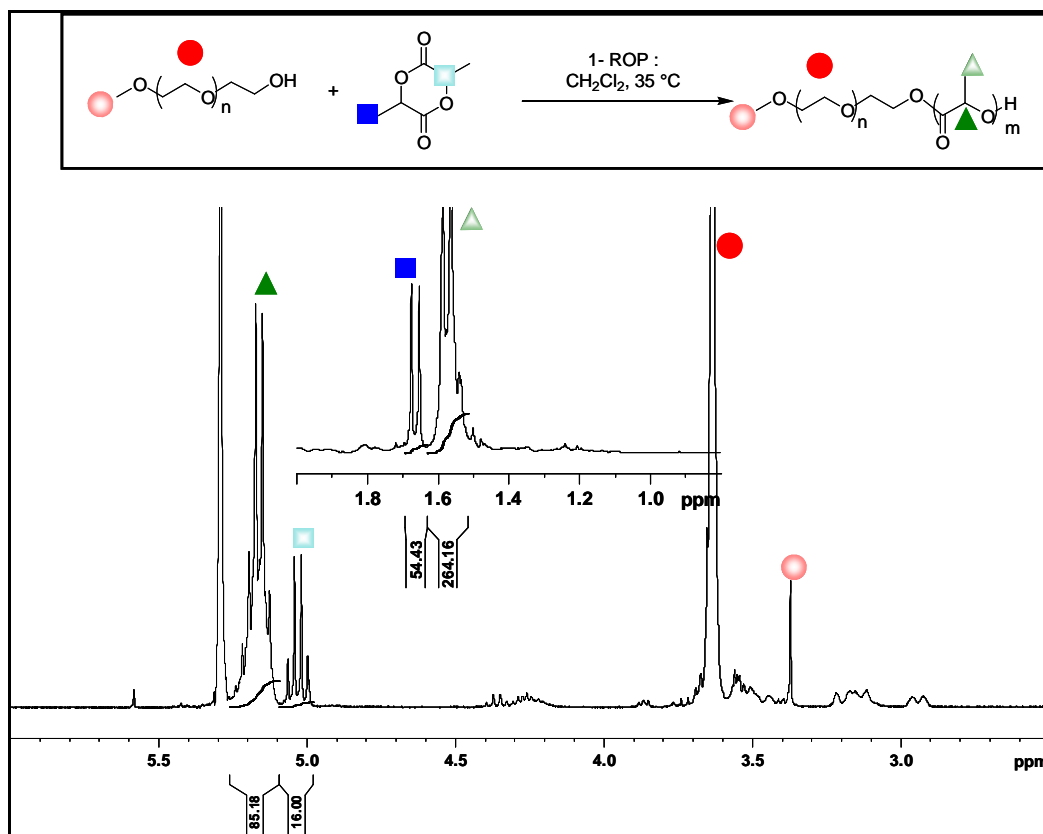
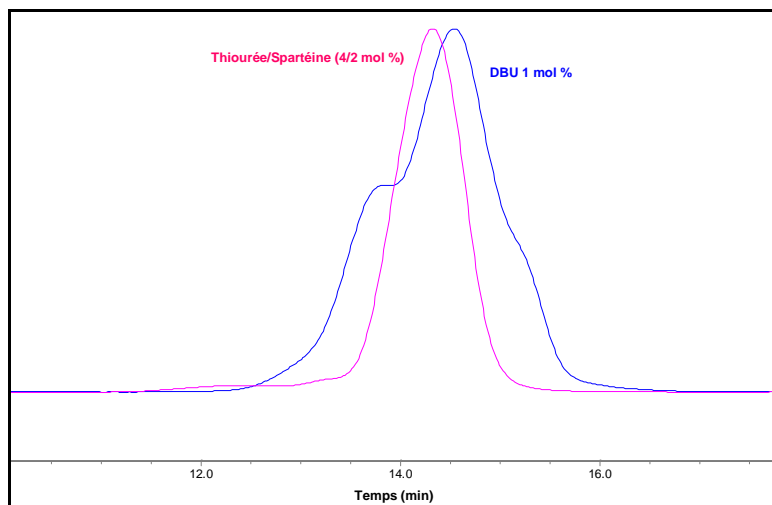


Figure 74 : Suivi de la ROP du *D,L*-lactide par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H (~ 85% de conversion).

En comparant l'amorceur moléculaire (Pentanol, expérience **1**) et le macroamorceur (mPEG-OH, expérience **2**), nous notons qu'il n'y a pas une influence significative sur le temps de conversion du monomère (de 30 min à 60 min). Les polymères obtenus avec ces deux amorceurs présentent des masses molaires proches des masses molaires théoriques et des distributions monomodales étroites ( $M_w/M_n < 1.11$ ). Ces résultats confirment ainsi l'efficacité du système catalytique thiourée/spartéine : incorporation totale de l'amorceur, conversion rapide et contrôlée du lactide et absence de produits indésirables (homopolymères de PLA).

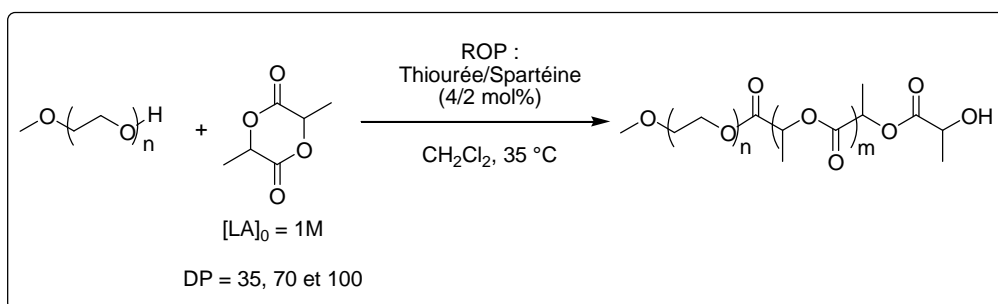
Parallèlement à ce système catalytique, nous avons exploré l'amidine 1,8-diazabicyclo[5.4.0]-undec-7-ène (DBU) pour la ROP du lactide à partir du macroamorceur mPEG-OH. La réaction se déroule à température ambiante dans le dichlorométhane en présence de 1 mol% de DBU (DP 100 et 70,  $[LA]_0 = 1M$ ). Une conversion complète du monomère (> 98 %) est atteinte au bout de quelques minutes (< 15 minutes). L'analyse du copolymère obtenu par SEC montre une population assez large ( $M_w/M_n > 1.30$ ) et qui présente un épaulement important vers les hautes masses et un autre vers les petites masses (Figure 75). Cette distribution s'élargit de plus en plus lorsque le temps de réaction est prolongé, à cause des réactions de transestérification. Ces observations illustrent bien la difficulté de contrôle de la

ROP avec la DBU. Les meilleurs résultats en termes de contrôle et d'efficacité sont obtenus avec le système thiourée/spartéine.



**Figure 75 : Profils SEC des copolymères mPEG<sub>2000</sub>-PLA (DP 70) synthétisés par ROP en présence de DBU (bleu) et de thiourée/spartéine (rose).**

Après cette étude préliminaire, nous avons choisi d'utiliser le couple catalytique thiourée/spartéine pour préparer des copolymères mPEG<sub>2000</sub>-PLA linéaires avec différentes longueurs de chaîne de PLA (5000, 10000 et 14400 g/mol). La ROP est conduite donc avec différents degrés de polymérisation (DP = nombre de moles du monomère/nombre de moles de l'amorceur = 35, 70 et 100) (Figure 76). La réaction est effectuée dans les mêmes conditions décrites plus haut ( $[LA]_0 = 1M$ , à 35 °C en présence de 4 mol % de thiourée et de 2 mol % de spartéine). Le temps de conversion complète (> 98 %) du lactide est compris entre 30 minutes et 1 heure. En fin de polymérisation, le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite suivi d'une précipitation du copolymère obtenu dans l'Et<sub>2</sub>O à 0 °C. Le précipité est ensuite lavé avec un minimum de MeOH froid afin d'éliminer complètement les catalyseurs. Le groupement hydroxyle terminal de la chaîne de PLA doit rester libre pour une conjugaison ultérieure avec le principe actif.



**Figure 76 : ROP du *D,L*-lactide à l'aide du mPEG<sub>2000</sub>-OH linéaire.**

Les différents copolymères linéaires synthétisés sont ensuite caractérisés par SEC. Avec cette technique, nous confirmons l'incorporation complète de tout le mPEG-OH. Nous obtenons ainsi des distributions monomodales étroites ( $M_w/M_n < 1.15$ ) avec des masses molaires proches des masses théoriques déterminées par RMN  $^1\text{H}$ . Les résultats sont détaillés dans le Tableau 4.

Copolymères	DP	Temps (h)	$M_{w(\text{SEC})}$ (g/mol)	$M_{n(\text{SEC})}$ (g/mol)	$M_w/M_n$	$M_{n(\text{RMN})}$ (g/mol)
Linéaires	100	1	18150	16500	1.10	16100
	70	1	13455	11700	1.15	11900
	35	0.5	7560	6750	1.12	7400

Tableau 4 : Propriétés des mPEG<sub>2000</sub>-PLA linéaires obtenus par ROP avec thiourée/spartéine.

#### Synthèse du copolymère de structure Y mPEG<sub>2000</sub>-PLA-Y-OR

Avec le même esprit, nous avons menés des études de ROP préliminaires pour préparer les copolymères de structure Y. Pour ce faire, nous avons commencé par tester le mPEG-diols afin d'étudier la possibilité de faire propager deux chaînes de PLA voisines. Enfin, les mPEG-OR-OH préparés (**IV**, **IV'**) ont été testés, et ce dans le but d'étudier l'effet de cet encombrement sur les étapes d'amorçage et de propagation de la ROP. Les résultats sont détaillés dans le Tableau 5.

Entrée	ROH	$[\text{LA}]_0/[\text{ROH}]$	Temps (h)	Conversion %	$M_n(\text{th})^b$ (g/mol)	$M_n(\text{SEC})^c$ (g/mol)	$M_w/M_n^c$
3	mPEG <sub>2000</sub> -(OH) <sub>2</sub>	100	1	98	16215	13050	1.15
4	mPEG <sub>2000</sub> -OTBDPS-Y-OH	100	6	98	16490	16150	1.14
5	mPEG <sub>2000</sub> -OTIPS-Y-OH	100	3	98	16372	16200	1.12

Polymérisation de D,L-Lactide (Concentration  $[\text{LA}]_0$  : 1M dans DCM), à 35 °C, avec 4 mol% de Thiourée et 2 mol% de Spartéine.

<sup>a</sup> Conversion : obtenu par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ .

<sup>b</sup>  $M_n(\text{th})$  : calculé à partir de la masse molaire du lactide \*  $[\text{LA}]_0/[\text{ROH}]$  \* Conversion + la masse molaire de l'amorceur ROH.

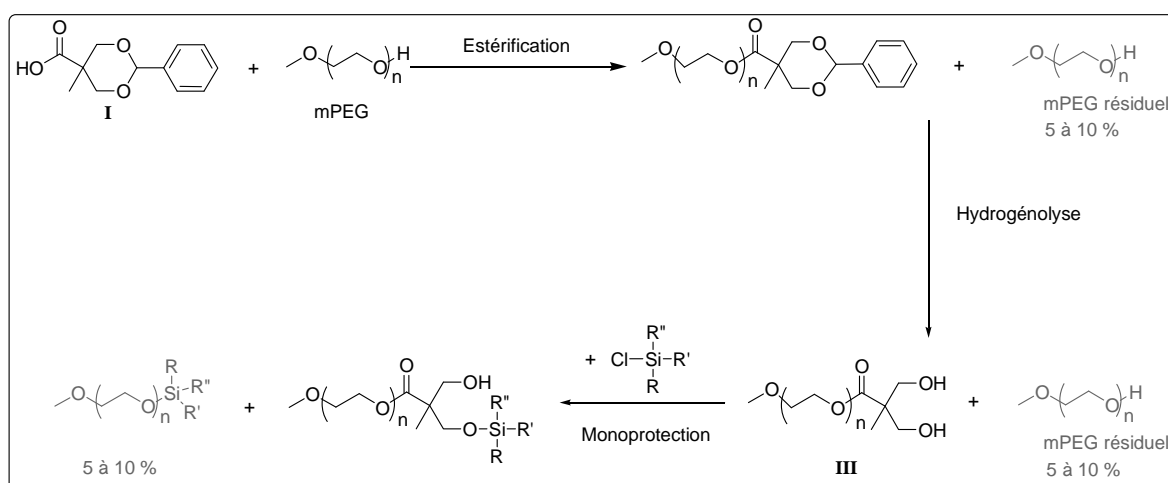
<sup>c</sup>  $M_n(\text{SEC})$  et  $M_w/M_n$  : obtenus à partir de la SEC (dans le THF), en utilisant des standards de polystyrène.

Tableau 5 : Propriétés des mPEG<sub>2000</sub>-PLA de structure Y obtenus par ROP avec le système Thiourée/Spartéine.

La ROP amorcée par le mPEG-(OH)<sub>2</sub> (expérience **3**), où il y a propagation de deux chaînes de PLA simultanément, montre une masse molaire en SEC inférieure à la masse molaire théorique calculée par RMN. Ce phénomène pourrait être expliqué par la conformation non linéaire de la macromolécule (polymère en Y ou terpolymère). Cette conformation Y semble avoir une affinité avec la phase stationnaire en SEC différente, en comparaison avec les polymères linéaires. L'encombrement dû aux deux chaînes de PLA ne semble pas ralentir la conversion du monomère en comparaison avec le mPEG-OH.

Les polymères obtenus sont généralement bien définis. Ils présentent en SEC des distributions de masse monomodales avec de faibles indices de polymolécularité ( $M_w/M_n < 1.15$ ). Par ailleurs, une augmentation du temps de conversion a été observée avec les macroamorceurs en Y « encombrés » (expériences **4** et **5**), en comparaison avec le mPEG-OH et le mPEG-(OH)<sub>2</sub>. La durée passe d'une heure pour le mPEG-OH à 3 h pour le mPEG-OTIPS-Y-OH (**IV'**) et 6 h pour le mPEG-OTBDPS-Y-OH (**IV**). Cette différence pourrait être expliquée par l'encombrement stérique causé par les groupements protecteurs TIPS et TBDPS. Le temps de conversion est d'autant plus long que le groupement protecteur est encombré (TBDPS).

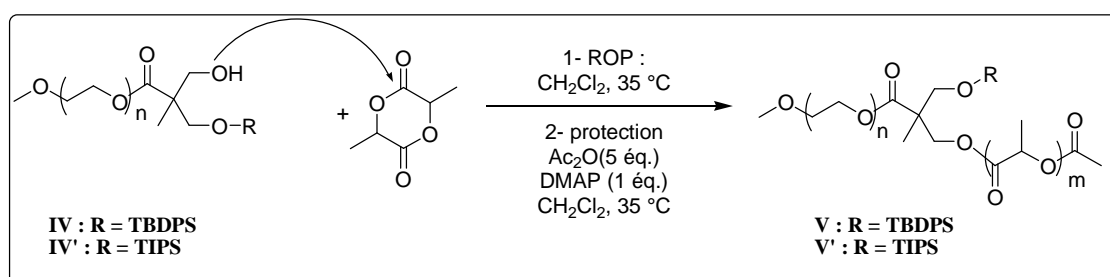
Une attention particulière doit être donnée à l'analyse du copolymère, surtout à la présence de macroamorceur résiduel. En effet, dans certains cas, une petite population vers 2000 g/mol a été détectée en SEC. Cette population correspond à une chaîne de mPEG, éliminée par lavage au MeOH. L'analyse RMN <sup>1</sup>H à haut champ (500 MHz) montre qu'il s'agit de la macromolécule mPEG-OSiR<sub>3</sub>. Cette impureté proviendrait du mPEG-OH résiduel présent dans le milieu (Figure 77).



**Figure 77 : Schéma de synthèse montrant l'origine de l'impureté mPEG<sub>2000</sub>-OSiR<sub>3</sub>.**

Ce défaut de couplage était difficilement détectable par spectroscopie RMN à faible champ (300 MHz, spectroscopie de routine au sein du laboratoire), mais bien détectable à haut champ (500 MHz). Ces observations montrent bien encore une fois l'importance de l'analyse poussée de tous les intermédiaires réactionnels. L'utilisation systématique du haut champ en RMN (500 MHz) nous a permis d'augmenter la résolution des signaux RMN et d'éviter ainsi des conversions partielles au cours de différentes réactions, ceci étant un point critique étant donné que la séparation des produits macromoléculaires à base de mPEG est impossible.

Après cette preuve de concept grâce à ces études préliminaires, nous avons procédé à la ROP du *D,L*-lactide avec différents degrés de polymérisation ( $DP = 35, 70$  et  $100$ ), à partir des deux macroamorceurs sous forme Y [mPEG-OTBDPS-Y-OH (**IV**) et mPEG-OTIPS-Y-OH (**IV'**)]. Comme dans le cas des copolymères linéaires, la réaction se déroule à  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  en présence de  $4\text{ mol } \%$  de thiourée et de  $2\text{ mol } \%$  de spartéine. En fin de polymérisation (conversion  $> 98\%$ ), l'hydroxyle terminal de la chaîne PLA est protégé *in situ* par acétylation avec l'anhydride acétique ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ). Cette protection permet d'éviter les réactions indésirables, mettant en jeu l'hydroxyle terminal de la chaîne de PLA, lors des prochaines étapes. Les conditions optimales de cette protection mettent en jeu l'utilisation de 5 équivalents d'anhydride acétique et d'un équivalent de DMAP (le temps de réaction est d'environ 1h30) (Figure 78).



**Figure 78 : ROP du *D,L*-lactide à l'aide du macroamorceur mPEG<sub>2000</sub> fonctionnalisé.**

Comme nous l'avons mentionné plus haut, le suivi de la conversion du monomère est effectué par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$ . Nous utilisons également la même technique pour quantifier la protection de la chaîne de PLA. En effet, l'acétyle terminal de la chaîne de PLA présente un singulet à  $2.12\text{ ppm}$ . L'intégration de ce dernier permet de retrouver le bon ratio des deux extrémités de chaîne (*MeO* du mPEG/*AcO* du PLA :  $3/3$ ).

L'analyse des différents copolymères synthétisés par SEC a permis de confirmer l'incorporation complète de tout le mPEG-OR-Y-OH par l'obtention de distributions monomodales étroites (Figure 79) et l'absence de pic résiduel vers  $2000\text{ g/mol}$ . Les masses moléculaires obtenues sont proches des masses théoriques et des masses moléculaires des copolymères linéaires décrits précédemment (Tableau 6).

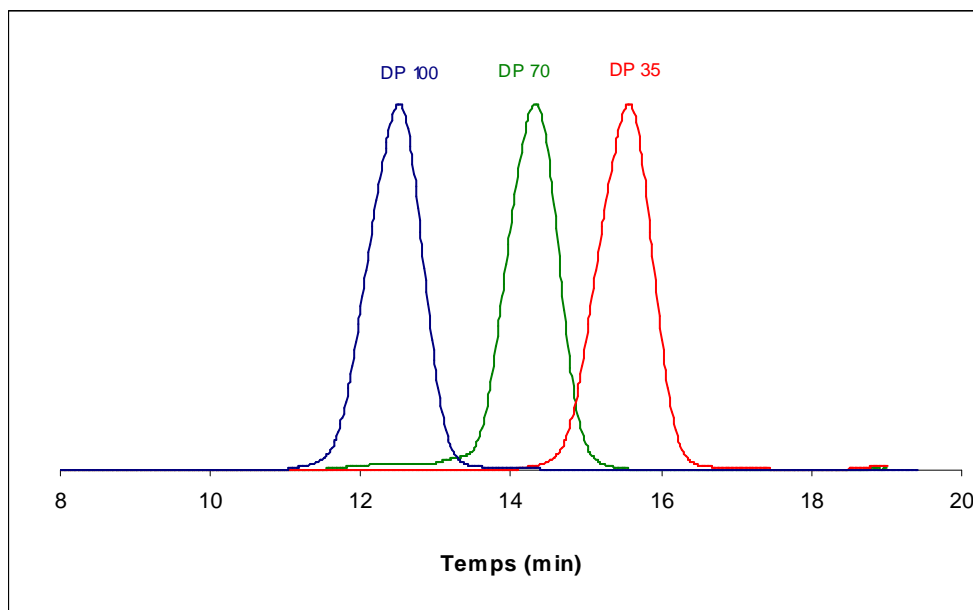


Figure 79 : Chromatogrammes SEC des copolymères en Y (DP 35, 70 et 100).

Copolymères	DP	Temps (h)	$M_{w(SEC)}$ (g/mol)	$M_{n(SEC)}$ (g/mol)	$M_w/M_n$	$M_{n(RMN)}$ (g/mol)
<b>Structures Linéaires</b>	100	1	18150	16500	1.10	16100
	70	1	13455	11700	1.15	11900
	35	0.5	7560	6750	1.12	7400
<b>Structures en Y (Protection TIPS, V')</b>	100	3	18140	16200	1.12	16320
	70	3	13630	11850	1.15	12100
	35	2	8025	6800	1.18	7550

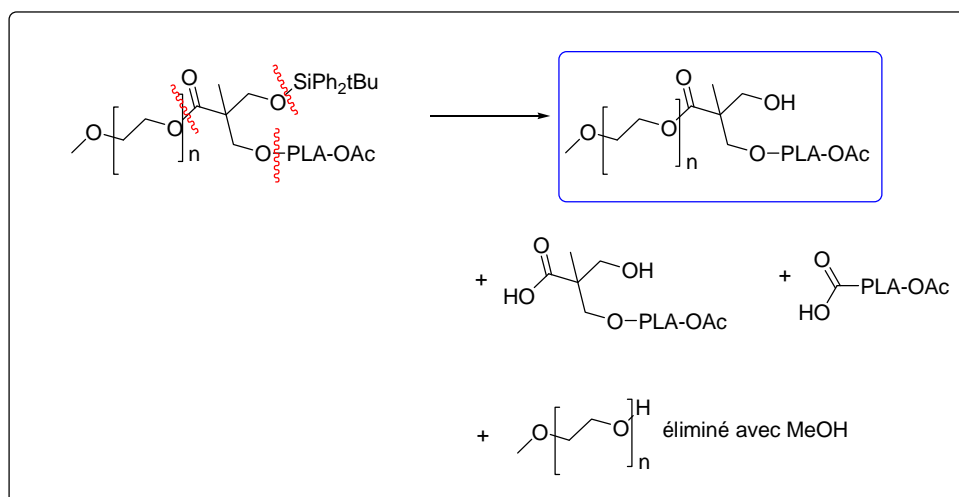
Tableau 6 : Propriétés des PEG-PLA obtenus par ROP avec thiourée/spartéine.

Une fois les copolymères en Y obtenus, la prochaine étape consiste à déprotéger la fonction hydroxyle qui se trouve en position Y, entre le mPEG et le PLA.

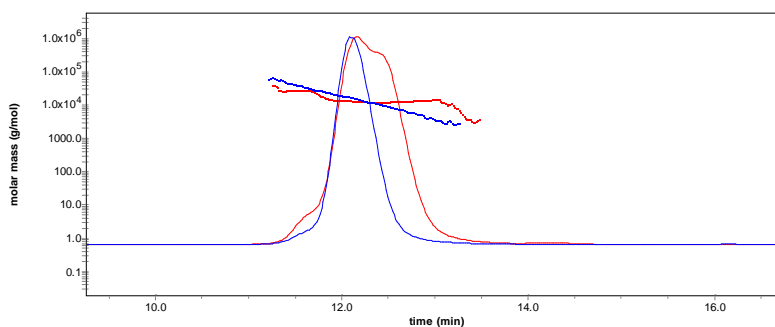
### 3. Déprotection du copolymère en Y

Différents agents ont été décrits dans la littérature pour la déprotection d'éthers silylés.<sup>[60]</sup> Dans notre cas, il est primordial de sélectionner un agent capable à la fois de déprotéger l'éther silylé et garder l'intégrité du copolymère, qui contient une chaîne de polyester (PLA) assez fragile. En effet, le fluorure de tétra-n-butylammonium (TBAF) semble être un bon candidat pour la déprotection d'éthers silylés. La réaction est effectuée dans le THF anhydre avec addition progressive de 5 équivalents de TBAF (solution dans le THF). Une déprotection totale est atteinte au bout de 5 à 7 h de réaction, mais une dégradation du copolymère est observée par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  quand il s'agit d'un scale-up de quelques grammes. En effet, quel que soit le groupement protecteur TBDPS ou TIPS, généralement, la proportion du

PEG diminue d'environ 25 à 60% par rapport à celle du PLA (Figure 80). L'analyse par SEC montre également une diminution de la masse moléculaire accompagnée par une forte augmentation de l'indice de polymolécularité ( $M_w/M_n$  de 1.15 à plus de 1.45) (Figure 81). Cette dégradation pourrait être corrélée à la forte basicité/nucléophilie de l'ion fluorure de l'agent de déprotection TBAF.<sup>[61]</sup> Le tamponnage de TBAF avec l'acide acétique et la diminution de la température du milieu réactionnel conduisent également à la dégradation du copolymère.



**Figure 80 : Dégradation du copolymère mPEG-PLA-Y-OSiR<sub>3</sub> lors de l'étape de déprotection.**



**Figure 81 : Profil SEC du copolymère Y avant et après déprotection avec TBAF.**

Une autre alternative consiste à utiliser l'acide de Lewis  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  comme agent de déprotection. Selon les travaux de Hedrick *et al.*,<sup>[62]</sup> il serait possible d'éliminer le groupement silylé, en présence d'une structure macromoléculaire (le polyméthacrylate de méthyle (PMMA)), à l'aide d'un grand excès (50 équivalents) de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Nous avons testé différentes conditions expérimentales : nombre d'équivalents en  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , méthode d'ajout, température et concentration du milieu réactionnel. Avec le groupement TBDPS, dans la majorité des tests, la déprotection complète n'est pas atteinte. De plus, la réaction est toujours



accompagnée d'une dégradation du copolymère (essentiellement une diminution de la proportion du PEG d'environ 50%).

En revanche, dans le cas du groupement TIPS, nous avons réussi à optimiser les conditions de déprotection avec  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . Une déprotection totale et sélective est obtenue en ajoutant goutte-à-goutte 50 équivalents de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  à 0 °C. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 h à 0 °C, ensuite porté à 30 °C pendant 19 h (Figure 82).

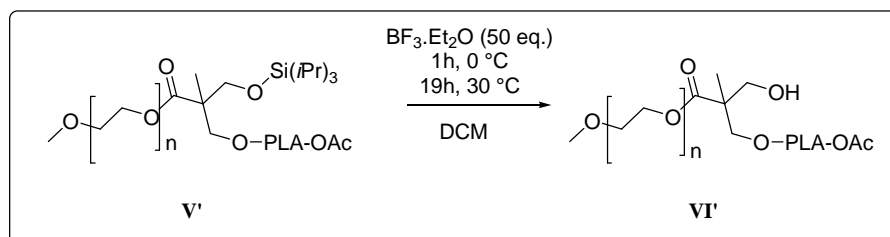


Figure 82 : Déprotection du copolymère mPEG-PLA-Y-OTIPS à l'aide de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .

La purification du produit est effectuée par précipitation dans l' $\text{Et}_2\text{O}$  et lavage avec MeOH. La spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  permet de confirmer la déprotection totale et le maintien des proportions de PEG et de PLA. La SEC confirme également la conservation de la masse molaire du copolymère et de son étroite distribution (Figure 83 et Tableau 7).

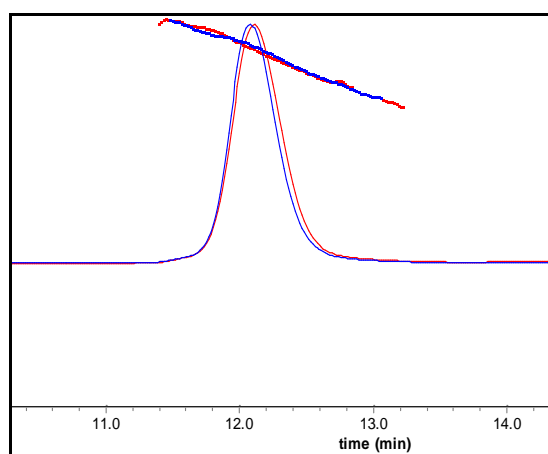


Figure 83 : Profils SEC du copolymère mPEG-PLA-Y-OTIPS (DP 70) avant et après déprotection avec  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .

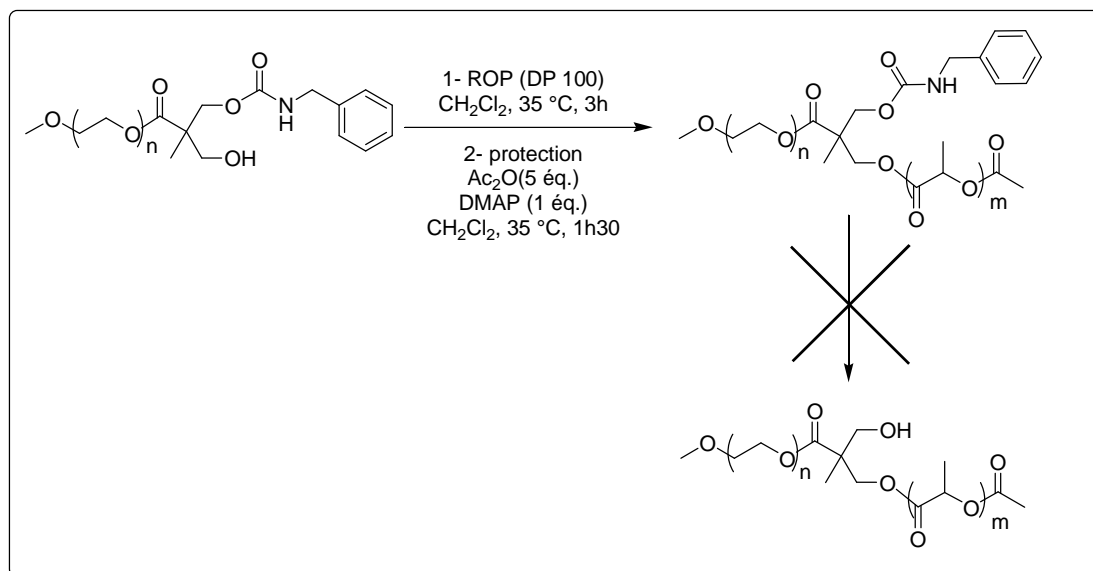
Copolymères	DP	$M_{w(\text{SEC})}$ (g/mol)	$M_{n(\text{SEC})}$ (g/mol)	$M_w/M_n$	$M_{n(\text{RMN})}$ (g/mol)
	100	18600	15900	1.17	16050
<b>Structures en Y</b>	70	13925	11800	1.18	11850
	35	7890	6750	1.17	7350

Tableau 7 : Propriétés des copolymères mPEG-PLA-Y-OH après déprotection avec  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ .

#### 4. Stratégie carbonate : ROP et hydrolyse de la liaison carbamate

Concernant la stratégie mettant en jeu le macroamorceur mPEG-carbamate-OH (Figure 84), la ROP s'est déroulée dans les mêmes conditions que dans le cas des macroamorceurs **IV** et **IV'**. Une conversion complète a été atteinte au bout de 3 heures en présence de 100 équivalents de lactide (DP 100). L'acétylation de la fonction hydroxyle terminale de la chaîne PLA a été réalisée *in situ* en ajoutant 5 équivalents d'anhydride acétique et 1 équivalent de DMAP comme catalyseur. L'avancement de l'acétylation a été suivi par RMN  $^1\text{H}$ , comme décrit précédemment. Le copolymère obtenu a été ensuite purifié par précipitation dans l'éther à 0 °C et rincé par le MeOH froid. Le copolymère, analysé par SEC, montre une distribution monomodale étroite avec une masse moléculaire proche de la masse théorique ( $M_{n(\text{SEC})} = 17050 \text{ g/mol}$ ,  $M_{n(\text{RMN})} = 16700 \text{ g/mol}$ ,  $M_w/M_n = 1.10$ )

Des tests de déprotection de la fonction hydroxyle protégée sous forme de carbamate ont été ensuite réalisés. La réaction de déprotection a été investiguée par hydrogénolyse dans un mélange d'AcOEt/AcOH et en présence d'acide acétique (sans lequel il n'y a pas de réaction). Malheureusement, l'hydrogénolyse totale du benzylcarbamate s'est avérée impossible avec ce dernier système. Cette réaction a été suivie par RMN  $^1\text{H}$  à l'aide des signaux aromatiques du groupement benzylcarbamate (vers 7.3 – 7.4 ppm).



**Figure 84 : Voie de synthèse carbonate – Elimination impossible de la liaison carbamate après l'étape de ROP.**

A ce stade, nous avons pu synthétiser de manière contrôlée des copolymères linéaires mPEG-PLA-OH et des copolymères Y mPEG-PLA-Y-OH. Dans la dernière étape de notre approche,

nous allons procéder à la conjugaison des ces copolymères avec le principe actif, via différents espaceurs.

## IV. Conjugaison avec un anticancéreux

### 1. Introduction

Comme cela a été mentionné dans le Chapitre I, selon la nature de l'espaceur qui lie le PA au polymère, la libération du PA pourrait se faire selon différents modes d'hydrolyse : passive, enzymatique, pH-dépendante ou réductive.

Dans le cas des conjugués de PEG-PLA/taxane, les espaceurs d'esters sont les plus utilisés dans la littérature. En plus de leur simplicité, ils sont clivables facilement, et leur vitesse d'hydrolyse est contrôlée en modifiant leur squelette (succinique, glutarique, diglycolique...).

Dans notre étude, nous avons choisi de commencer les premiers tests avec l'espaceur succinique. En effet, cet espaceur, simple et largement utilisé dans la littérature, pourrait être facilement conjugué au PA et à la macromolécule, à partir de l'ouverture de l'anhydride succinique correspondant. Ensuite, d'autres espaceurs (glutarique, diglycolique...) seront testés pour analyser leur effet sur le profil de libération du principe actif.

### 2. Couplage du Cabazitaxel avec les copolymères mPEG-PLA via différents espaceurs

Depuis la découverte du paclitaxel, la chimie des taxanes a bien été étudiée afin de produire différents dérivés permettant ainsi d'améliorer leur activité anticancéreuse et réduire leurs effets secondaires. Comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre I, le groupement hydroxyle en position C-2' est indispensable pour l'activité biologique des taxanes. Cet hydroxyle secondaire est le moins encombré par rapport aux autres fonctions hydroxyle en positions C-10, C-7 et C-1, ce qui lui confère une meilleure réactivité chimique.<sup>[63]</sup> Quelques dérivés d'esters en position C-2' ont été élaborés, mais il s'est avéré que cette transformation inhibe l'interaction des taxanes avec la tubuline. Dans certains cas, ces taxanes avec une fonction ester en position C-2' sont biologiquement actifs, ils sont donc considérés comme étant des prodrogues.<sup>[64]</sup> Ils retrouvent ainsi leur activité après hydrolyse de la fonction ester et régénération de la fonction hydroxyle en position C-2'.

Les premières études d'estérification des taxanes en position C-2' ont essentiellement été destinées à l'amélioration de leur solubilité dans l'eau sous forme de prodrogues.<sup>[63;65]</sup> Parmi

les méthodes de dérivation de l'hydroxyle en position C-2', nous pouvons citer l'utilisation de certains anhydrides cycliques : anhydride succinique, anhydride glutarique.<sup>[63]</sup> La fonctionnalisation du paclitaxel (3 hydroxyles libres : C-2', C-7 et C-1) avec l'un de deux anhydrides a permis d'obtenir majoritairement le mono-ester en position C-2' (> 95%). A ce produit s'ajoute l'obtention d'une impureté (< 5%) correspondant au diester en positions C-2' et C-7 et qui a été éliminé par cristallisation. Cette fonctionnalisation sélective a été conduite dans une solution de pyridine à température ambiante. En revanche, L'utilisation de la DMAP, comme base plus forte, à température élevée (85 °C) a permis la dérivation de l'hydroxyle moins réactif en position C-7 pour obtenir le diester (Figure 85). Dans les deux derniers cas, l'hydroxyle tertiaire en position C-1 reste non réactif.

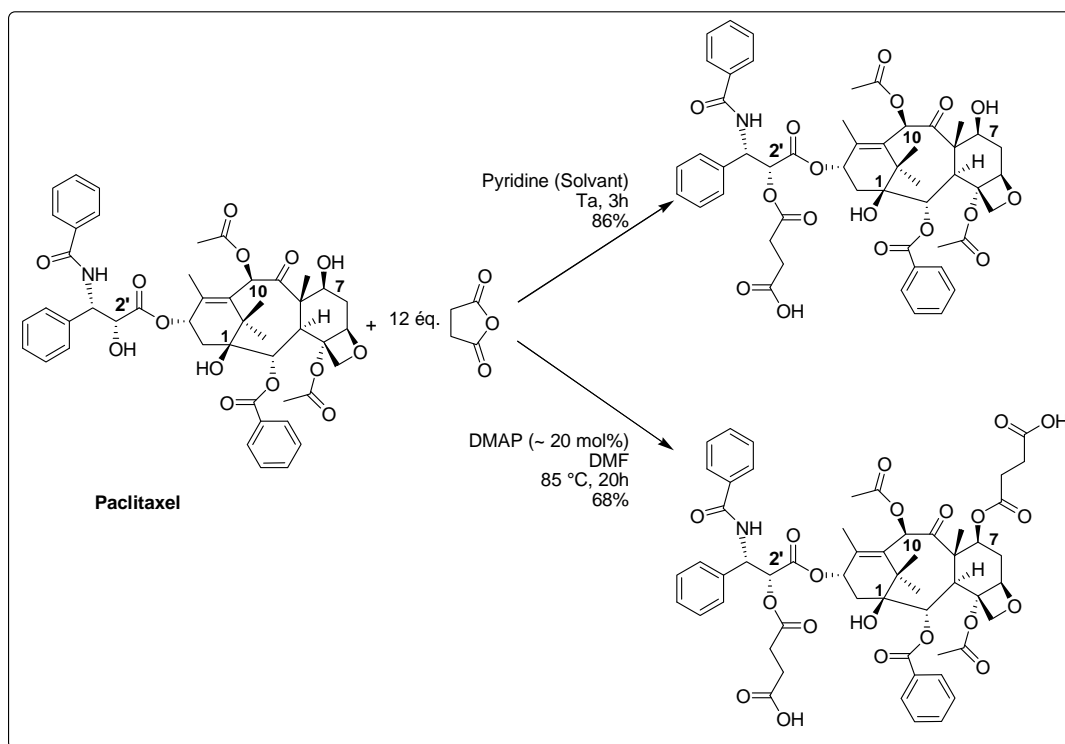


Figure 85 : Schémas de synthèse du paclitaxel mono-ester et diester.

Dans notre projet, nous avons choisi dans un premier temps de travailler avec une molécule de taxane développée par Sanofi : le cabazitaxel<sup>[66]</sup> (Figure 86). Cette molécule est commercialisée par Sanofi sous le nom de Jevtana<sup>®</sup> et formulée à l'aide d'un mélange de polysorbate 80 (tensioactif non-ionique) et d'éthanol pour une injection intraveineuse. Les deux molécules ont uniquement deux fonctions hydroxyles libres : l'hydroxyle secondaire en position C-2' et l'hydroxyle tertiaire en position C-1. Ceci réduit ainsi le risque de formation de produits secondaires rencontrée lors de la fonctionnalisation du paclitaxel et du docétaxel.

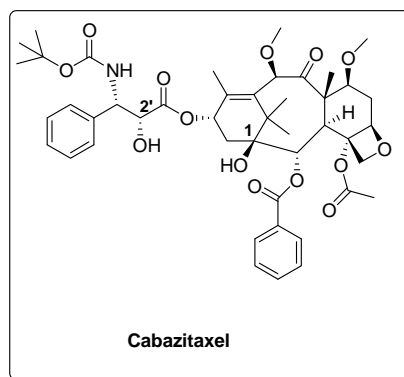


Figure 86 : Structure chimique du cabazitaxel.

Le couplage du principe actif avec les copolymères synthétisés précédemment pourrait s'effectuer de deux manières (Figure 87) : (i) l'espaceur choisi pourrait être couplé préalablement avec le copolymère, puis au PA (voie 1), ou (ii) avec le principe actif, puis au copolymère (voie 2).

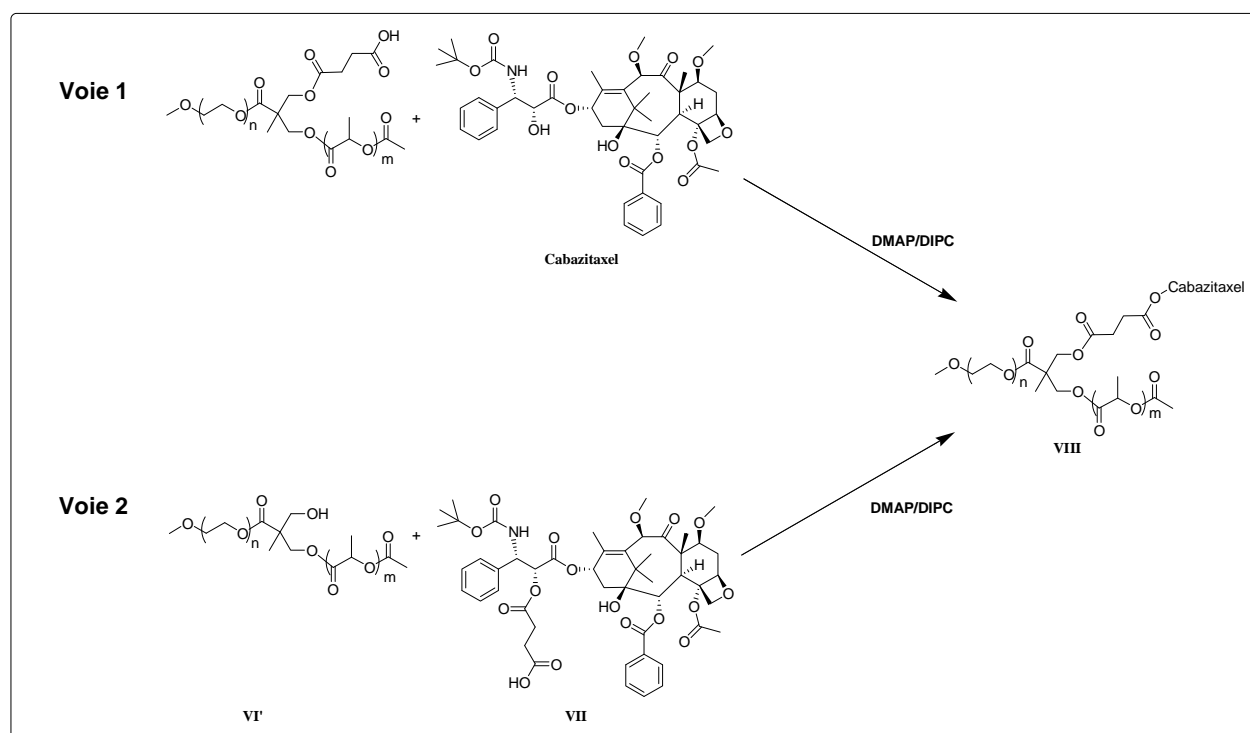


Figure 87 : Stratégies de couplage entre le polymère et le cabazitaxel.

Nous avons tout d'abord commencé par tester la première voie. Cette voie nous permettrait en effet de préparer différents copolymères avec différents espaceurs, qui seront ensuite couplés directement avec différents principes actifs non modifiés. Cette stratégie a l'avantage donc de minimiser les réactions supplémentaires sur le principe actif lui-même et d'éviter ainsi une dépense excessive de ce dernier. Pour ce faire, nous avons fait réagir le copolymère mPEG-PLA-Y-OH avec l'anhydride succinique dans le dioxane ou le DCM à 35 °C en présence de

DMAP.<sup>[67]</sup> Mais, malheureusement, la réaction est très lente (entre 24 h et 48 h), et n'est pas reproductible surtout à une grande échelle (quelques grammes). Des améliorations doivent être apportées aux conditions de réaction afin d'atteindre une ouverture efficace de l'anhydride par l'intermédiaire du copolymère.

Parallèlement à cette voie, nous avons envisagé d'étudier la deuxième voie. La fonctionnalisation du principe actif avec l'espaceur se fait en présence d'un excès d'anhydride succinique (ou glycolique ou glutarique), dans le DCM et en présence d'une quantité catalytique de DMAP (10 mol%). Après une nuit de réaction et après traitement, nous obtenons de bons rendements compris entre 85% et 95%. Les différents PA fonctionnalisés, avec les différents espaceurs, sont caractérisés par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , ainsi que par spectroscopie de masse. Nous avons bien vérifié la fonctionnalisation sélective au niveau de l'hydroxyle secondaire en position C-2'. Comme mentionné plus haut, le deuxième hydroxyle libre, étant tertiaire, n'est pas assez réactif pour permettre l'ouverture de l'anhydride (Figure 88).

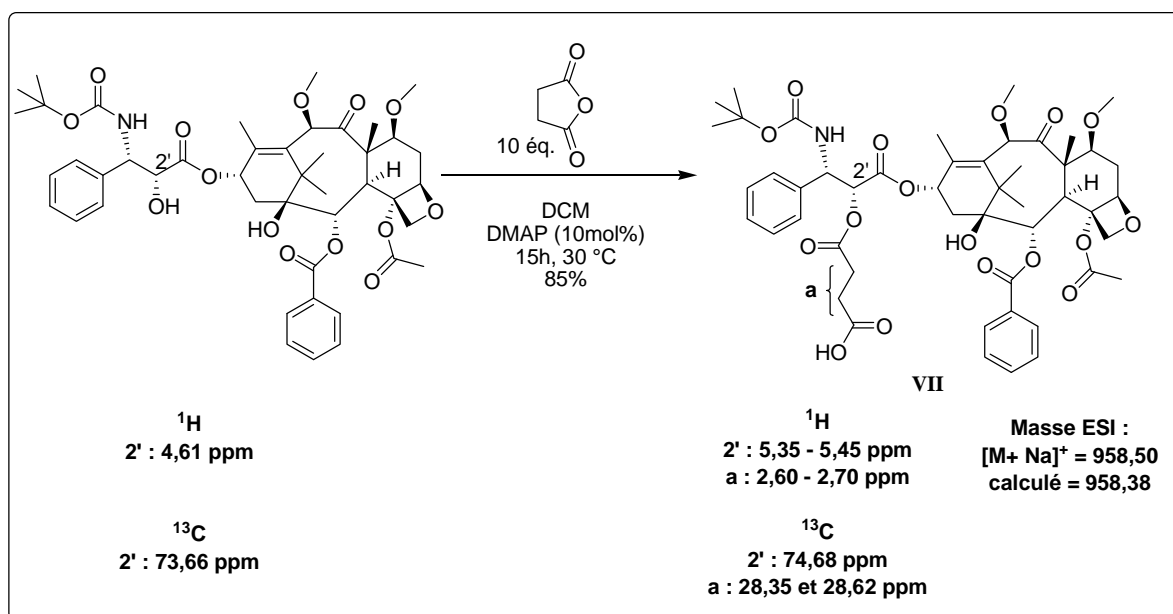
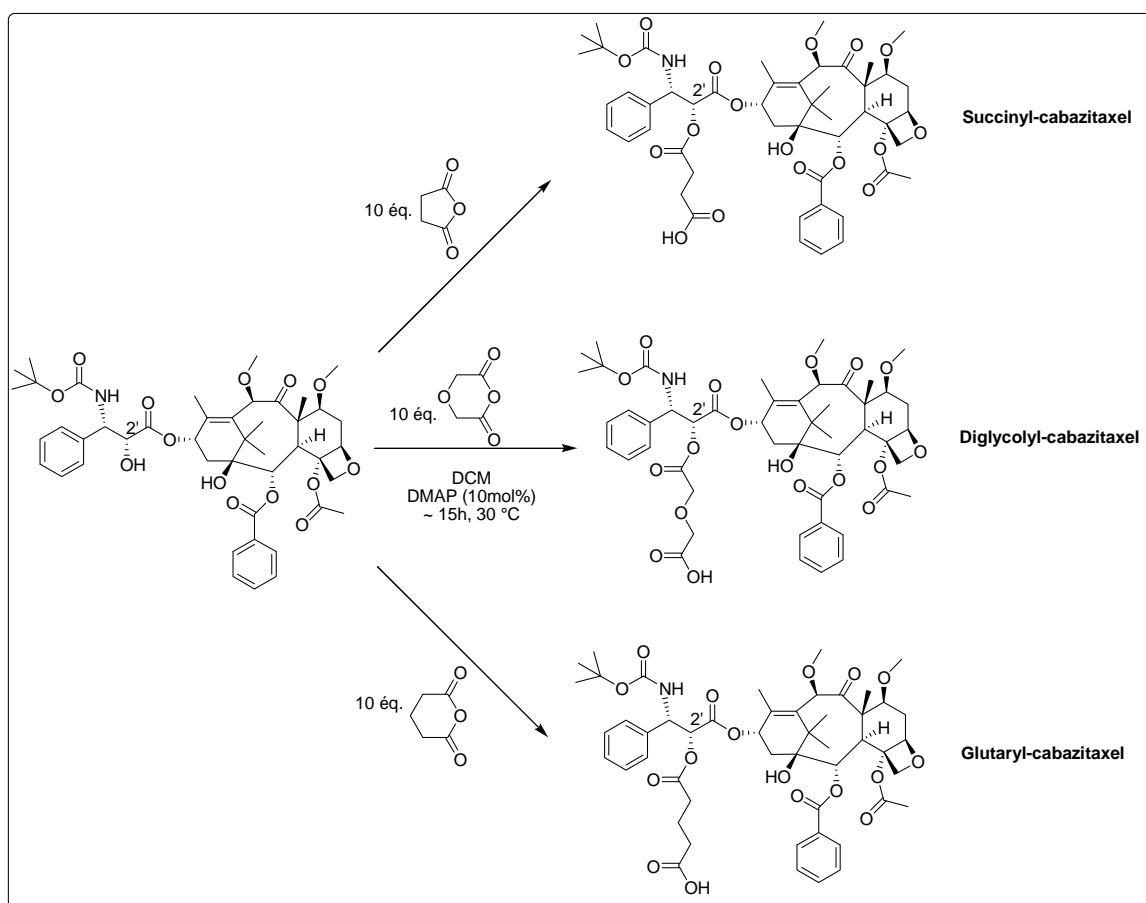


Figure 88 : Fonctionnalisation du Cabazitaxel avec l'espaceur succinique.

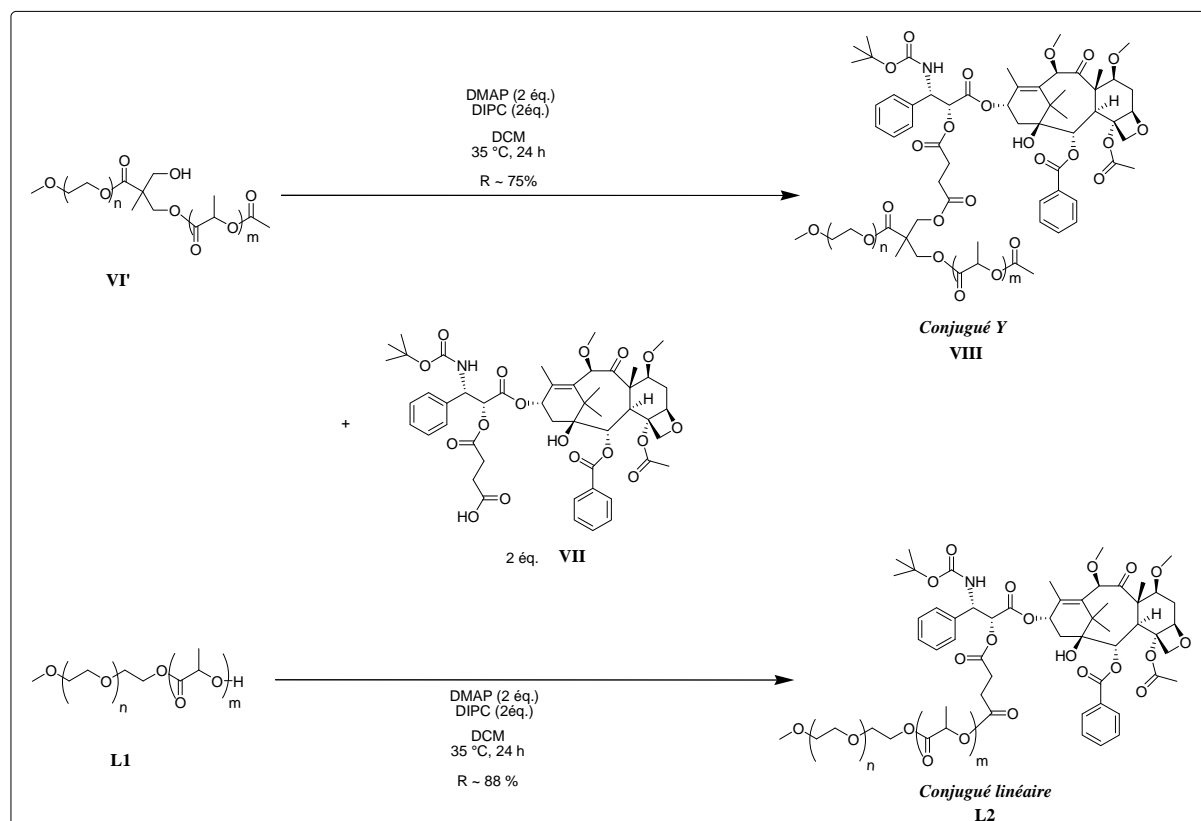
Dans le but d'étudier l'influence de la nature de l'espaceur sur les propriétés des nanovecteurs et sur la libération du PA, nous avons couplé le cabazitaxel à trois espaceurs différents : succinique, glutarique et diglycolique (Figure 89). Ces réactions ont été réalisées par ouverture des anhydrides correspondants dans les mêmes conditions décrites plus haut. Nous

rappelons que ces espaceurs se distinguent par la longueur, la nature chimique de la chaîne entre les fonctions carboxyliques (respectivement C2, C3 et COC).



**Figure 89 : Schémas de synthèse des entités « espaceur-cabazitaxel ».**

Les différents PA fonctionnalisés sont ensuite conjugués aux différents copolymères Y et linéaires. Cette conjugaison se fait par réaction d'estérification entre l'hydroxyle libre du copolymère et la fonction acide carboxylique de l'espaceur (Figure 90). Elle se fait dans le dichlorométhane (DCM) en présence de 2 équivalents d'espaceur-PA, de 2 équivalents de DMAP et de 2 équivalents de DIPC (ou préférentiellement EDCI) sous argon à 35 °C. Il est également possible de réaliser la réaction en présence d'environ 50% (w/w) de tamis moléculaire en poudre 4Å activé, afin de bien sécher le milieu réactionnel de toute trace d'eau (cf. conditions expérimentales).



**Figure 90 : Schéma de synthèse des conjugués mPEG-PLA/succinyl-cabazitaxel linéaire et Y (12 kDa).**

Il est à noter qu'il est très difficile en RMN  $^1\text{H}$  de différencier à l'état brut le conjugué final des deux produits de départ (copolymère et espaceur-PA), à cause de la superposition de leurs différents signaux. Le suivi de la réaction de couplage est donc réalisé après précipitation d'un prélèvement dans le MeOH à 0 °C. Ceci permet ainsi d'éliminer l'entité espaceur-PA qui n'a pas encore réagi avec le copolymère. L'élimination totale de l'espaceur-PA libre a été confirmée préalablement en réalisant un mélange physique de copolymère et d'espaceur-PA et en précipitant le mélange dans le MeOH à 0 °C. L'analyse du précipité par RMN  $^1\text{H}$  prouve l'absence de toute trace d'espaceur-PA adsorbé au copolymère.

Les premiers signes de couplage apparaissent donc après quelques heures de réaction (entre 10 et 30% de couplage après 6 heures). Le taux de couplage est déterminé en calculant le rapport des intégrations  $7\text{-OCH}_3/\text{CH}_3\text{O-PEG}$  (et  $10\text{-OCH}_3/\text{CH}_3\text{O-PEG}$ ), après calibration du spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) à l'aide du singulet correspondant au  $\text{CH}_3\text{O-PEG}$  (3H) (Figure 91) : taux de conversion =  $7\text{-OCH}_3/\text{CH}_3\text{O-PEG} = 2.6/3 = 87\%$ . Le haut champ 500 MHz donne une meilleure résolution et du coup une meilleure estimation du taux de couplage, en comparaison avec le 300 MHz. Une conjugaison totale est généralement atteinte au bout de 24 heures. Le produit final est ensuite purifié par précipitation dans le MeOH à 0 °C. Le précipité



peut être lavé avec du pentane pour drainer le MeOH piégé dans le conjugué afin de faciliter son séchage sous vide.

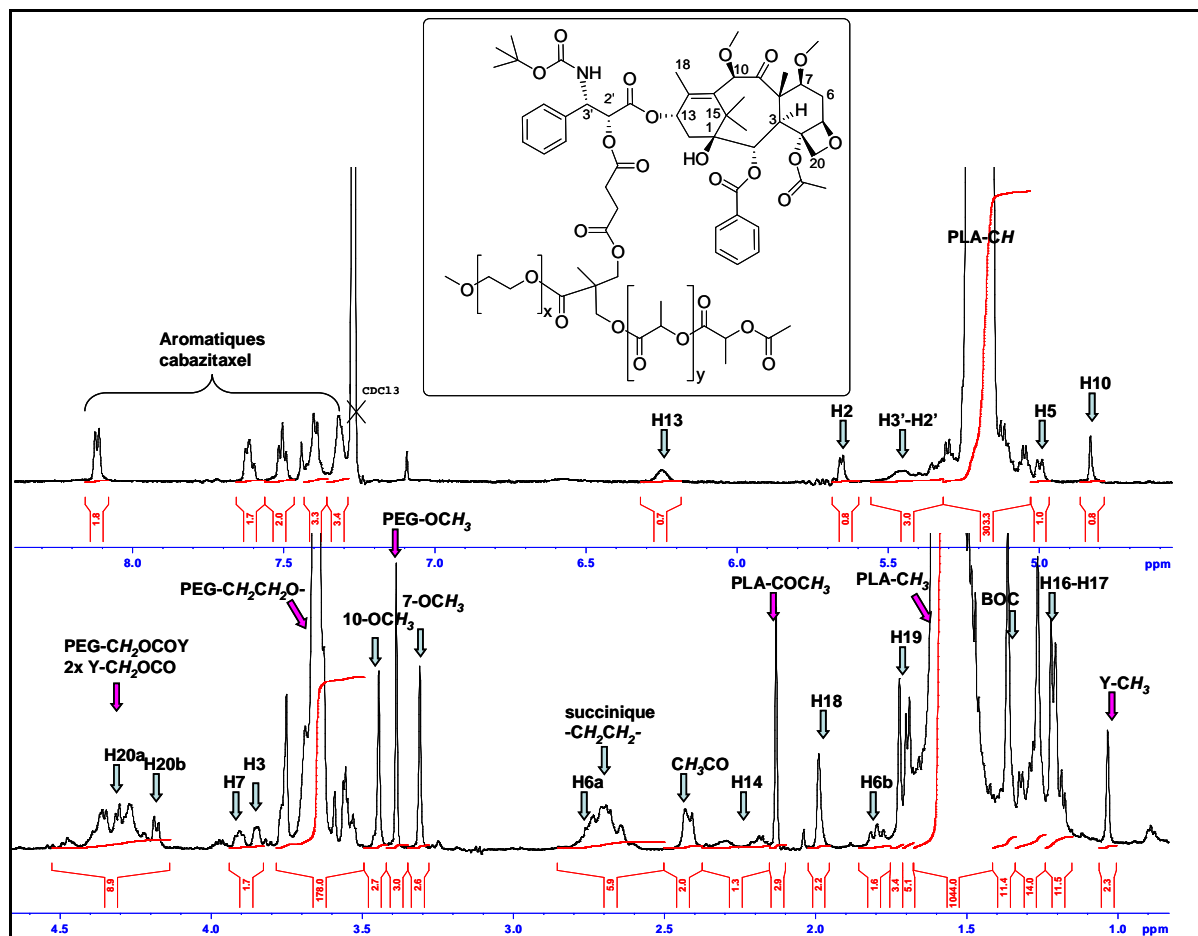


Figure 91 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) du conjugué mPEG-PLA-Y-succinyl-cabazitaxel (12 kDa) à 87% de conjugaison.

Comme cela a été mentionné précédemment, les conjugués à base de PEG-PLA/taxane décrits dans la littérature présentent de faibles degrés de caractérisation (RMN  $^1\text{H}$  et SEC).<sup>[2;58;59]</sup> Il est donc difficile de quantifier précisément le greffage et la pureté du conjugué désiré. Les deux techniques, RMN  $^1\text{H}$  et SEC, permettent d'estimer la proportion de principe actif et la masse moléculaire du conjugué final, mais, elles ne donnent pas une information précise sur la présence ou l'absence de principe actif libre. De plus, le taux de couplage estimé dans ces études, par RMN  $^1\text{H}$ , est situé entre 50% et 70%, ce qui limite donc le taux de charge en principe actif au sein des nanovecteurs.<sup>[58;59]</sup>

Dans le cadre de notre projet, comme nous l'avons décrit tout au long de ce chapitre, nous avons essayé d'optimiser la synthèse des conjugués afin d'atteindre le taux de couplage le plus élevé possible, à savoir 100%. De plus, nous avons insisté sur l'utilisation de techniques

d'analyse performantes dans le but de caractériser les produits synthétisés de manière très précise : RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{29}\text{Si}$  (500 MHz), MALDI-TOF, spectroscopie de masse, SEC. Dans le cas des conjugués finaux, il est très important de déterminer la pureté des produits et de quantifier de façon très précise le taux de couplage et les espèces non conjuguées. Cette quantification est primordiale pour déterminer le taux de charge en PA des formulations. Nous avons donc choisi d'utiliser différentes techniques d'analyse complémentaires afin de bien caractériser les conjugués et de s'assurer de leur pureté.

Tout d'abord, nous avons commencé par vérifier par UPLC (de l'anglais «*Ultra Performance Liquid Chromatography*») l'absence des espèces libres, espaceur-PA et PA. Le cabazitaxel et l'espaceur-cabazitaxel ont été injectés séparément à différentes concentrations, et élués avec un gradient d'acide trifluoroacétique/eau et d'acide trifluoroacétique/acétonitrile. La colonne utilisée consiste en une colonne BEH C18 et la détection se fait à l'aide d'un détecteur UV à 227 nm. Des courbes de calibration, à base de cabazitaxel et d'espaceur-cabazitaxel, ont été ensuite tracées. Lorsqu'un mélange de cabazitaxel et de succinyl-cabazitaxel est injecté, ces deux derniers montrent deux temps d'élutions distincts (0.97 et 0.88 minutes, respectivement) (Figure 92). Les conjugués synthétisés mPEG-PLA/Succinyl-Cabazitaxel (linéaire et Y) ont été injectés dans les mêmes conditions, et comme indiqué par le chromatogramme de la Figure 92, aucun signal correspondant au cabazitaxel ou au succinyl-cabazitaxel n'a été détecté (dans le cas du conjugué linéaire, un pic très négligeable est détecté). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les conjugués Y et linéaires mettant en jeu les deux autres espaceurs (diglycolique et glutarique).

La méthode UPLC utilisée permet de détecter de très faibles quantités de cabazitaxel (ou espaceur-cabazitaxel) libre. En effet, lorsque 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de conjugué linéaire (12 kDa) à 0.5 mg/mL [contenant donc 0.35  $\mu\text{g}$  de cabazitaxel pour un taux de charge de 7% (w/w)] sont injectés, nous arrivons à évaluer environ 1.5 ng d'espèce libre (Figure 92). Cette valeur correspond à environ 0.42% de la quantité totale de cabazitaxel. Avec cette très haute précision, les analyses UPLC démontrent clairement la possibilité de détecter de très faibles proportions d'espèces libres au sein du conjugué final [jusqu'à 0.4% (w/w)].

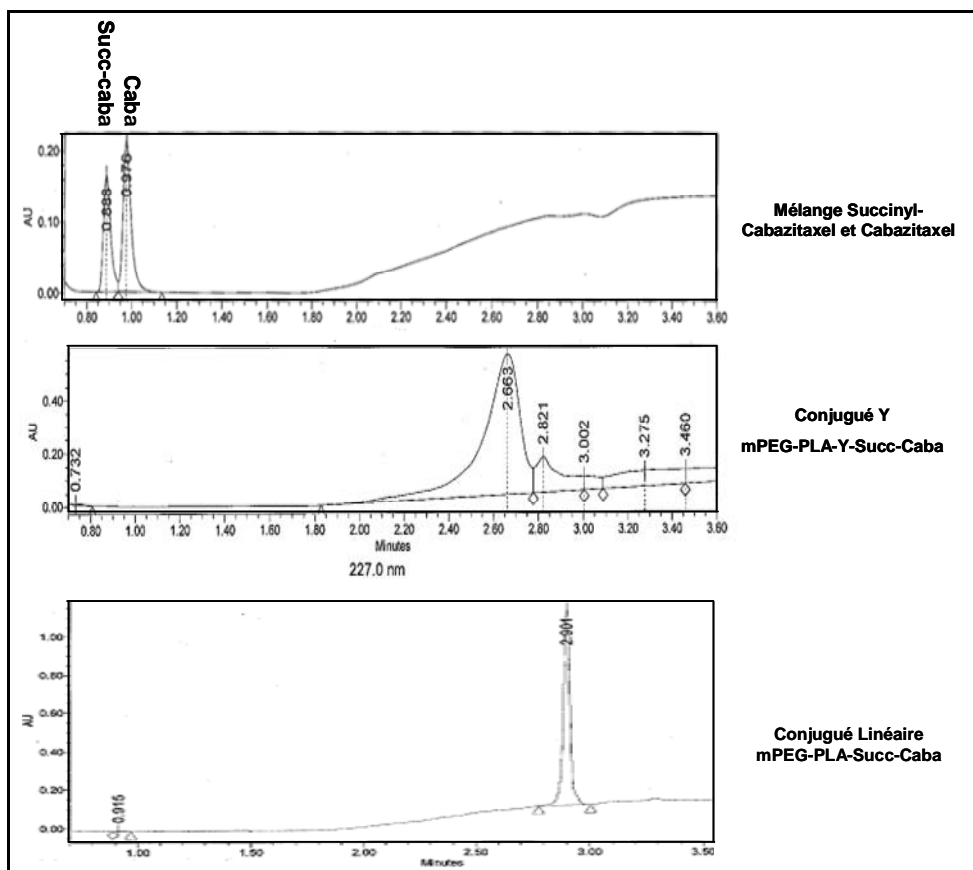


Figure 92 : Chromatogrammes UPLC du mélange Succinyl-Cabazitaxel/Cabazitaxel et du Conjugué Y correspondant (12 kDa).

Le conjugué correspondant, quant à lui, est élué à environ 2.66 minutes sous forme d'un large pic. Le profil UV de cette espèce est différent de celui du copolymère correspondant et très semblable à celui du cabazitaxel (deux maxima vers 227 nm et 270 nm) (Figure 93). Il semble donc que le cabazitaxel soit bien couplé au copolymère.

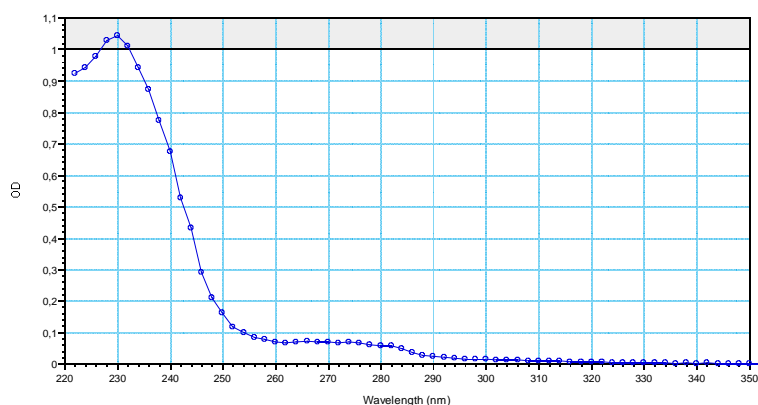


Figure 93 : Profil UV du cabazitaxel.

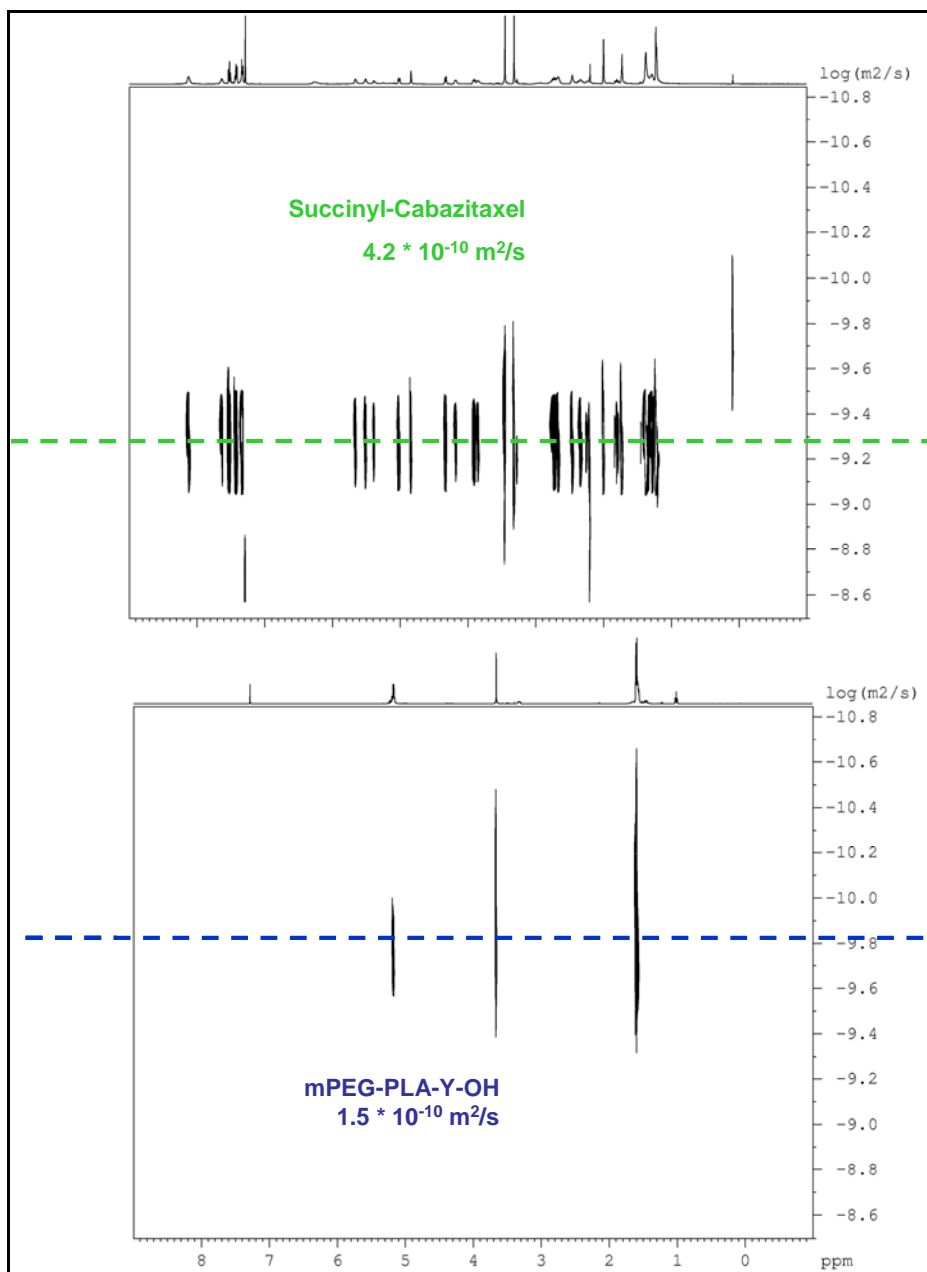
Nous avons également utilisé une deuxième technique pour confirmer l'absence de cabazitaxel libre et la conjugaison du PA avec le copolymère. Il s'agit de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  DOSY.

La RMN  $^1\text{H}$  DOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY)<sup>[68]</sup> est une technique RMN puissante souvent décrite comme la "chromatographie en tube". C'est une méthode bidimensionnelle qui se base sur les différences de diffusion translationnelle de solutés permettant de distinguer sans séparation physique les composants d'un mélange en solution. Dans la première dimension du spectre DOSY, le spectre RMN  $^1\text{H}$  du produit analysé est tracé et dans la deuxième dimension, c'est le coefficient de diffusion qui est reporté. Ce dernier diminue généralement avec l'augmentation de la masse moléculaire. En effet, pour un modèle sphérique, le coefficient de diffusion ( $D$ ) est lié au rayon hydrodynamique ( $R_H$ ) du composé par la relation de Debye-Einstein :

$$D = k_B T / 6\pi\eta R_H$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température absolue et  $\eta$  la viscosité du solvant.

L'entité succinyl-cabazitaxel seule montre un coefficient de diffusion de l'ordre de  $4.2 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (Figure 94). Le copolymère mPEG-PLA-Y-OH (12 kDa) présente également un seul coefficient de diffusion d'environ  $1.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ , qui corrèle avec les signaux RMN  $^1\text{H}$  des chaînes de PEG et de PLA. Comme attendu, ce dernier est inférieur à celui de l'entité succinyl-cabazitaxel puisque la masse moléculaire de cette dernière molécule est bien inférieure à celle du copolymère (935 g/mol vs 12000 g/mol), ce qui résulte en un plus faible rayon hydrodynamique. Le mélange physique du copolymère et du succinyl-cabazitaxel montrent, quant à lui, la coexistence de deux espèces séparées avec les mêmes coefficients de diffusion. Ce résultat prouve donc l'absence de phénomène d'adsorption entre le copolymère et le succinyl-cabazitaxel.



**Figure 94 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  DOSY du succinyl-cabazitaxel et du copolymère mPEG-PLA-Y-OH (12 kDa), dans le  $\text{CDCl}_3$ .**

Dans le cas du conjugué final mPEG-PLA-Y-Succinyl-Cabazitaxel (12 kDa), nous notons la présence d'un unique coefficient de diffusion de l'ordre de  $1.5 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  (Figure 95). Ce coefficient corrèle à la fois avec les signaux RMN  $^1\text{H}$  relatifs au copolymère et au cabazitaxel, ce qui prouve une nouvelle fois que le cabazitaxel est bien couplé au copolymère. Il est à noter que le copolymère et le conjugué correspondant possèdent le même coefficient de diffusion. Le couplage du cabazitaxel semble donc ne pas avoir d'influence significative sur le rayon hydrodynamique du copolymère, à cause de la faible masse moléculaire du succinyl-cabazitaxel en comparaison avec le copolymère (935 g/mol vs 12000 g/mol). Le spectre RMN

$^1\text{H}$  DOSY du conjugué montre également l'absence de cabazitaxel ou de succinyl-cabazitaxel libres, même si la limite de détection de la DOSY est supérieure à celle de la méthode UPLC ( $\sim 5\%$  vs  $< 0.4\%$ ).

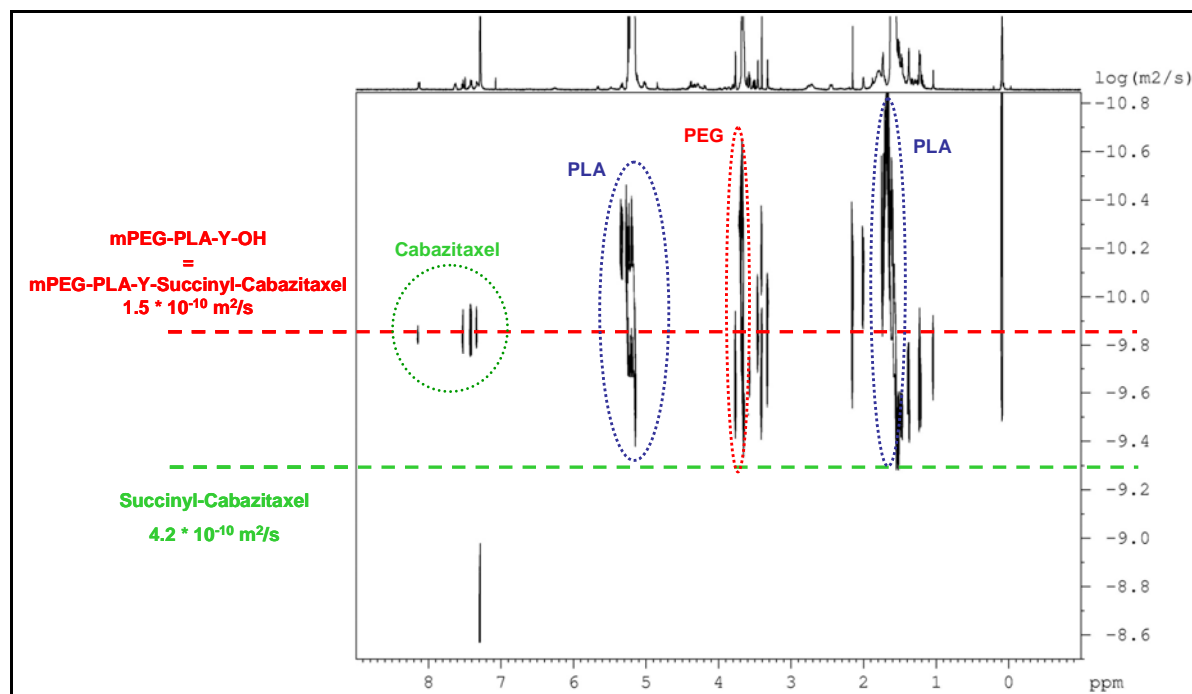


Figure 95 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  DOSY du conjugué mPEG-PLA-Y-Succinyl-Cabazitaxel (12 kDa), dans le  $\text{CDCl}_3$ .

Après vérification de l'absence de PA libre, il est maintenant essentiel de quantifier le cabazitaxel couplé au copolymère. Pour ce faire, nous nous basons sur la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  à haut champ (500 MHz), comme nous l'avons expliqué précédemment. Après purification et séchage des différents conjugués linéaires et de structure Y, nous enregistrons leurs spectres RMN  $^1\text{H}$ . Sur tous ces spectres, nous notons la présence des signaux caractéristiques de la chaîne de mPEG, de la chaîne de PLA, de l'espaceur et du PA. Dans la Figure 96, le spectre RMN  $^1\text{H}$  correspondant au conjugué mPEG-PLA-Y-succinyl-cabazitaxel est présenté. La calibration des intégrations est basée sur le singulet  $\text{CH}_3\text{O-PEG}$  (3.39 ppm) qui intègre pour 3 protons. Ce singulet caractérise une chaîne de copolymère de mPEG-PLA-Y-OH. Nous procédons ensuite à l'intégration des différents signaux du cabazitaxel et de l'espaceur. Les deux singulets correspondants aux acétyles 7- $\text{OCH}_3$  (3.32 ppm) et 10- $\text{OCH}_3$  (3.45 ppm) du cabazitaxel intègrent chacun pour 3 protons, ce qui traduit une molécule de cabazitaxel pour une molécule de copolymère. Nous confirmons bien donc la quantification d'une molécule de cabazitaxel par chaîne de copolymère ( $\sim 100\%$  de couplage). L'erreur due à aux différentes intégrations peut être estimée à moins de 5%.

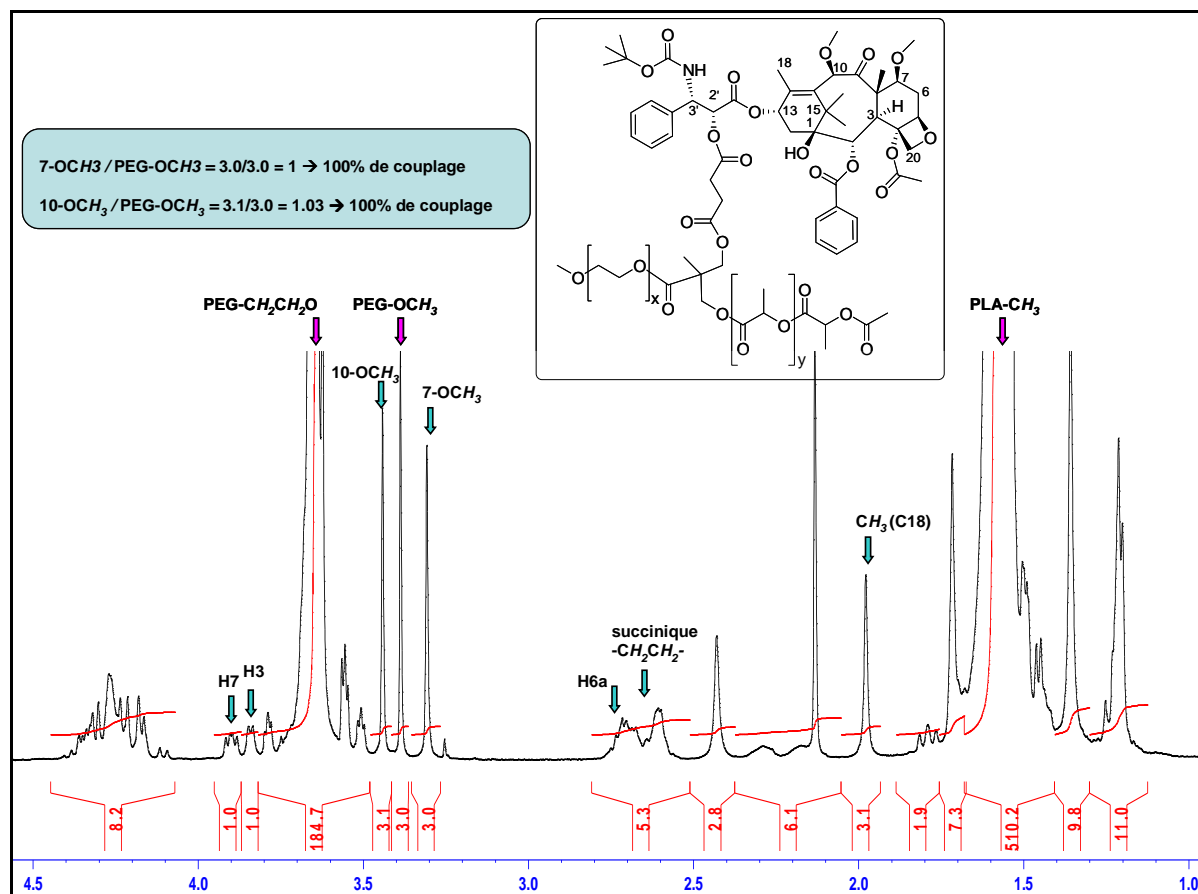


Figure 96 : Aperçu du spectre RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) du conjugué mPEG-PLA-Y-succinyl-Cabazitaxel (VIII, 12 kDa).

Les masses moléculaires des différents conjugués linéaires et en structure Y ont été ensuite analysées par SEC. Les résultats sont détaillés dans le Tableau 8.

Conjugués	DP	Copolymères avant couplage			Conjugués		
		M <sub>n</sub> (SEC) (g/mol)	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	M <sub>n</sub> (RMN) (g/mol)	M <sub>n</sub> (SEC) (g/mol)	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	M <sub>n</sub> (RMN) (g/mol)
Linéaires	100	16500	1.10	16100	16400	1.13	16800
	70	11700	1.15	11900	10970	1.15	12250
Structures en Y	100	15900	1.17	16050	16450	1.12	16500
	70	11800	1.18	11850	11770	1.15	13230
	35	6750	1.17	7350	7100	1.18	8200

Tableau 8 : Masses moléculaires des copolymères et des conjugués finaux correspondants.

Ces conjugués gardent bien une distribution monomodale étroite (faibles indices de polymolécularité  $M_w/M_n$ ), avec des masses moléculaires proches des masses moléculaires théoriques calculées par RMN <sup>1</sup>H. Cependant, nous remarquons en SEC que la conjugaison du cabazitaxel n'a pas d'influence significative sur la masse moléculaire des conjugués, en comparaison avec les copolymères correspondants. Cette observation peut être expliquée par

l'erreur attribuée à la technique de SEC et/ou par la structure chimique du principe actif (une moitié tétracyclique et une chaîne latérale). Le rayon de giration de cette structure chimique est très probablement faible par rapport à la structure polymérique qui est généralement sous forme de pelote. Il en résulte donc un rayon de giration bien plus élevé.

## V. Conclusion

A ce stade, nous avons pu préparer, de manière contrôlée, des conjugués linéaires et pour la première fois des conjugués de structure Y. En ce qui concerne la préparation de cette structure originale, la stratégie mettant en jeu le groupement de protection silylé encombré, typiquement le TIPS, nous a permis de synthétiser l'intermédiaire clé : le macroamorceur mPEG-OR-Y-OH. D'autres pistes ont été testées pour la synthèse de ce macroamorceur, qui ne se sont pas avérées concluantes et qui devraient être approfondies davantage.

Nous avons donc privilégié la stratégie de monoprotection du mPEG-diol à l'aide de l'agent silylé TIPS. Ce dernier a permis l'accès au macroamorceur. Son élimination par la suite a été effectuée de manière efficace sans dégradation du polymère, contrairement au TBDPS où nous avons rencontré quelques problèmes lors de la déprotection. Ensuite, lors de l'étape de ROP, nous avons utilisé le système catalytique bifonctionnel thiourée/spartéine. Ce couple de catalyseurs a permis l'obtention des copolymères de manière contrôlée. Après déprotection de l'éther silylé du copolymère à l'aide de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , nous avons réussi à conjuguer les copolymères Y et linéaires au cabazitaxel tout d'abord via l'espaceur succinique. La synthèse de conjugués de structure Y a été transférée et développée avec succès au département de développement chimique de Sanofi à Vitry-sur-Seine. Ce transfert a permis d'élargir la conjugaison avec différents espaceurs et deux principes actifs différents et de synthétiser les conjugués à grande échelle (~ 15 g). De plus, les différents intermédiaires ainsi que les conjugués finaux ont été soumis à une caractérisation précise, ce qui a permis de bien quantifier le taux de couplage (de l'ordre de 100%).

Dans une seconde partie, nous allons étudier l'influence de la morphologie du copolymère et de la nature de ces espaceurs sur la préparation des nanoparticules, sur leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que sur le profil de libération du PA.



## Références

- [1] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, W. E. Rudzinski, *J. Controlled Release* **2001**, 70, 1-20.
- [2] X. Xu, X. Zhang, X. Wang, Y. Li, X. Jing, *Polym. Adv. Technol.* **2009**, 20, 843-848.
- [3] J. C. Rong Tong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47.
- [4] F. Nederberg, E. Appel, J. P. K. Tan, S. H. Kim, K. Fukushima, J. Sly, R. D. Miller, R. M. Waymouth, Y. Y. Yang, J. L. Hedrick, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 1460-1468.
- [5] R. C. Pratt, F. Nederberg, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Chem. Commun.* **2008**.
- [6] A. P. Goodwin, S. S. Lam, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6994-6995.
- [7] H. Ihre, O. L. Padilla De Jesus, J. M. J. Frechet, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123.
- [8] J. Muzart, *Synthesis* **1993**, 1993, 11,27.
- [9] C. David, *Tetrahedron* **2004**, 60, 5833-5871.
- [10] K. M. Sureshan, M. S. Shashidhar, T. Praveen, T. Das, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 4477-4504.
- [11] A. Alba, PhD Université Toulouse III - Paul Sabatier **2009**.
- [12] M. Trollsas, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4644-4651.
- [13] U. Annby, M. Malmberg, B. Pettersson, N. Rehnberg, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 3217-3220.
- [14] R. F. Cunico, L. Bedell, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4797-4798.
- [15] W. H. Carothers, G. L. Dorough, F. J. Natta, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, 54, 761-772.
- [16] O. Dechy-Cabaret, B. Martin-Vaca, D. Bourissou, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 6147-6176.
- [17] P. Degée, P. Dubois, R. Jérôme, S. Jacobsen, H. G. Fritz, *Macromol. Symp.* **1999**, 144, 289-302.
- [18] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser-Saunders, A. Stricker, *Macromolecules* **2000**, 33, 702-709.
- [19] A. Kowalski, A. Duda, S. Penczek, *Macromolecules* **2000**, 33, 7359-7370.
- [20] P. Degée, P. Dubois, R. Jérôme, *Macromol. Symp.* **1997**, 123, 67-84.
- [21] H. von Schenck, M. Ryner, A. C. Albertsson, M. Svensson, *Macromolecules* **2002**, 35, 1556-1562.
- [22] J. Baran, A. Duda, A. Kowalski, R. Szymanski, S. Penczek, *Macromol. Symp.* **1997**, 123, 93-101.
- [23] M. Wisniewski, A. L. Borgne, N. Spassky, *Macromol. Chem. Phys.* **1997**, 198, 1227-1238.
- [24] Z. Tang, X. Chen, X. Pang, Y. Yang, X. Zhang, X. Jing, *Biomacromolecules* **2004**, 5, 965-970.
- [25] N. Nomura, R. Ishii, M. Akakura, K. Aoi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5938-5939.
- [26] K. Majerska, A. Duda, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1026-1027.
- [27] A. L. Gutman, K. Zuobi, T. Bravdo, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 3546-3552.

- 
- [28] E. Vedejs, N. S. Bennett, L. M. Conn, S. T. Diver, M. Gingras, S. Lin, P. A. Oliver, M. J. Peterson, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7286-7288.
- [29] R. Singh, R. M. Kissling, M. A. Letellier, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.* **2003**, *69*, 209-212.
- [30] G. A. Grasa, T. Güveli, R. Singh, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 2812-2819.
- [31] S. Knapp, M. R. Madduru, Z. Lu, G. J. Morriello, T. J. Emge, G. A. Doss, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3583-3585.
- [32] H. M. L. Davies, P. Ren, Q. Jin, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3587-3590.
- [33] E. Vedejs, S. T. Diver, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3358-3359.
- [34] E. F. Connor, G. W. Nyce, M. Myers, A. Möck, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 914-915.
- [35] G. W. Nyce, T. Glauser, E. F. Connor, A. Möck, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3046-3056.
- [36] M. Myers, E. F. Connor, T. Glauser, A. Möck, G. Nyce, J. L. Hedrick, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2002**, *40*, 844-851.
- [37] F. Nederberg, E. F. Connor, M. Möller, T. Glauser, J. L. Hedrick, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2712-2715.
- [38] S. Matsumura, K. Tsukada, K. Toshima, *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, *25*, 161-167.
- [39] C. L. Lai, H. M. Lee, C. H. Hu, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6265-6270.
- [40] C. Bonduelle, B. Martin-Vaca, F.-P. Cossio, D. Bourissou, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 5304-5312.
- [41] S. Csihony, D. A. Culkin, A. C. Sentman, A. P. Dove, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9079-9084.
- [42] O. Coulembier, L. Mespouille, J. L. Hedrick, R. M. Waymouth, P. Dubois, *Macromolecules* **2006**, *39*, 4001-4008.
- [43] H. R. Kricheldorf, R. Dunsing, *Makromol. Chem.* **1986**, *187*, 1611-1625.
- [44] H. R. Kricheldorf, I. Kreiser, *Makromol. Chem.* **1987**, *188*, 1861-1873.
- [45] Y. Shibasaki, H. Sanada, M. Yokoi, F. Sanda, T. Endo, *Macromolecules* **2000**, *33*, 4316-4320.
- [46] X. Lou, C. Detrembleur, R. Jérôme, *Macromolecules* **2002**, *35*, 1190-1195.
- [47] F. Ben, D. Bourissou, R. Cherif-Cheikh, A. De Sousa Delgado, M. Graullier, B. Martin-Vaca, Use of a catalytic system for lactide and glycolide (co)oligomerization, [WO2005/100439], **2005**.
- [48] D. Bourissou, B. Martin-Vaca, A. Dumitrescu, M. Graullier, F. Lacombe, *Macromolecules* **2005**, *38*, 9993-9998.
- [49] A. G. Doyle, E. N. Jacobsen, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5713-5743.
- [50] T. Okino, Y. Hoashi, Y. Takemoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12672-12673.
- [51] A. P. Dove, R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13798-13799.
- [52] A. Berkessel, S. Mukherjee, F. Cleemann, T. N. Müller, J. Lex, *Chem. Commun.* **2005**, 1898-1900.

- [53] A. Berkessel, F. Cleemann, S. Mukherjee, T. N. Müller, J. Lex, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 807-811.
- [54] R. C. Pratt, B. G. G. Lohmeijer, D. A. Long, P. N. P. Lundberg, A. P. Dove, H. Li, C. G. Wade, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2006**, *39*.
- [55] U. Schuchardt, R. M. Vargas, G. Gelbard, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1995**, *99*, 65-70.
- [56] R. C. Pratt, B. G. Lohmeijer, D. A. Long, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4556-4557.
- [57] B. G. G. Lohmeijer, R. C. Pratt, F. Leibfarth, J. W. Logan, D. A. Long, A. P. Dove, F. Nederberg, J. Choi, C. Wade, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2006**, *39*.
- [58] X. Zhang, Y. Li, X. Chen, X. Wang, X. Xu, Q. Liang, J. Hu, X. Jing, *Biomaterials* **2005**, *26*.
- [59] J. Wang, W. Liu, Q. Tu, J. Wang, N. Song, Y. Zhang, N. Nie, J. Wang, *Biomacromolecules* **2010**, *12*, 228-234.
- [60] P. G. M. Wuts, T. W. Greene, in *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., **2006**, p. pp. 16-366.
- [61] J. H. Clark, *Chem. Rev.* **1980**, *80*, 429-452.
- [62] A. Heise, M. Trollsas, T. Magbitang, J. L. Hedrick, C. W. Frank, R. D. Miller, *Macromolecules* **2001**, *34*.
- [63] H. M. Deutsch, J. A. Glinski, M. Hernandez, R. D. Haugwitz, V. L. Narayanan, M. Suffness, L. H. Zalkow, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*.
- [64] D. Guenard, F. Gueritte-Voegelein, P. Potier, *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*.
- [65] T. Yamaguchi, N. Harada, K. Ozaki, H. Arakawa, K. Oda, N. Nakanishi, K. Tsujihara, T. Hashiyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*.
- [66] A. ES. Paller CJ, *Drug Des. Dev. Ther.* **2011**, *5*, 117-124.
- [67] O. Jeon, S. H. Lee, S. H. Kim, Y. M. Lee, Y. H. Kim, *Macromolecules* **2003**, *36*, 5585-5592.
- [68] C. S. Johnson Jr., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1999**, *34*, 203-256.



## ***Partie Expérimentale***



**Conditions générales de manipulation :**

Les solvants et réactifs sont utilisés tels quels, sauf lorsque cela est précisé. Toutes les synthèses et polymérisations sont effectuées sous atmosphère inerte d'argon en utilisant les techniques standards de Schlenk. Les solvants sont préalablement séchés et distillés avant usage : le dichlorométhane (DCM) sur hydrure de calcium, le toluène sur sodium ou avec un purificateur de solvant (système Mbraun MB-SPS-800), le tétrahydrofurane (THF) sur sodium, l'éther diéthylique sur sodium. Le DL-lactide (PURAC) est purifié par distillation azéotropique et recristallisation dans le toluène. Il est ensuite sublimé, puis stocké sous argon dans la boîte à gants.

**Caractérisations :**

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) : Les spectres RMN sont effectués à température ambiante sur des spectromètres Bruker Avance 300 MHz, Bruker Avance 400 MHz et Bruker Avance 500 MHz équipé d'une crysonde. Les déplacements chimiques  $\delta$  en  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont rapportés en ppm par rapport au solvant résiduel et en  $^{29}\text{Si}$  sont rapportés en ppm par rapport à  $\text{Me}_4\text{Si}$  comme standard externe. Les constantes de couplage  $J$  sont données en hertz. Les abréviations suivantes ont été employées pour décrire les signaux : s (singulet), l (large), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet).

DOSY RMN  $^1\text{H}$  : Les expériences de DOSY RMN  $^1\text{H}$  sont effectuées à 290K sur un spectromètre Bruker Avance 500 MHz, équipé d'une sonde Z-inverse triple résonance (TBI, 5 mm,  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ , BB). Une séquence d'écho de spin stimulé à gradient bipolaire pulsé a été utilisée. Durant l'expérience, le temps de relaxation est de 3 secondes, les FIDs sont collectés en 16 k points avec une acquisition de 16 scans. La puissance du gradient pulsé est augmentée de 5% à 95% en 16 étapes. Un temps de diffusion ( $\Delta$ ) de 180 ms et une durée d'application ( $\delta$ ) de 1.4 ms ont été appliqués. La durée de l'expérience est de 21 minutes pour chaque échantillon.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) : Les masses molaires moyennes en nombre  $M_n$ , et en poids  $M_w$  et les indices de polymolécularité ( $M_w/M_n$ ) sont mesurées par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) à 35°C avec une chaîne triple détection composée d'une Alliance Waters e2695, d'un détecteur de diffusion de la lumière MALS miniDAWN (Wyatt), d'un viscomètre Viscostar-II (Wyatt) et d'un réfractomètre Waters 2414. Le THF est utilisé comme éluant à un débit de 1.0 mL/min. Une précolonne Styragel (WAT054405) et deux colonnes Shodex (KF-802.5 et KF-804) sont utilisées. Les calibrations

sont effectuées avec des standards polystyrènes (400-100 000 g/mol). La préparation des échantillons est effectuée de la manière suivante : le produit à analyser (10 à 20 mg) est dissout dans 1 ml de THF contenant du toluène comme marqueur. La solution est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre 0.45  $\mu$ m.

**Spectrométrie de masse** : Les spectres de masse par ionisation chimique (DCI) sont effectués sur un spectromètre DSQ Thermo Fisher Scientific. Les spectres de masse par ionisation électrospray (ESI-MS) sont effectués sur un spectromètre Perkin Elmer Sciex API-365 ou un spectromètre Applied Biosystem QTrap en mode positif.

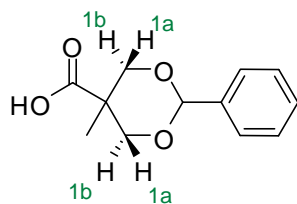
**MALDI-TOF-MS** : Les analyses sont réalisées sur un spectromètre MALDI Micro MX<sup>TM</sup> Waters équipé d'un laser à 337nm. Une tension d'accélération de 20 kV est appliquée. Des spectres de masse de 1 000 tirs sont accumulés. L'échantillon de polymère est dissout dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à une concentration de 1 mg/mL. L'agent de cationisation utilisé est NaI, dissout dans le méthanol à une concentration de 10 mg/ml. La matrice utilisée est du dithranol, dissout dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> à une concentration de 10 mg/ml. Les solutions de matrice, de sel et de polymère sont mélangées respectivement dans des ratios volumiques de 3/1/1. La solution résultante est spotted sur une cible MALDI en acier inox et séchée. Le spectre est enregistré en mode réflectron. Les corrections de ligne de base et les données analytiques sont traitées avec le logiciel MassLynx version 4.1. Les masses molaires moyennes en nombre  $M_n$  sont déterminées avec le logiciel Polymerix Software, Sierra Analytics, Version 2.0.0.

**Conditions UPLC** : Les analyses en chromatographie UPLC ont été réalisées sur une chaîne UPLC équipée d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV PDA (Acquity UPLC, Waters). La colonne utilisée est une Colonne Acquity UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1x50 mm ; Débit 0.3 mL/min ; Température colonne 35 °C ; Temps d'expérience 5 min ; Détection UV à 275 nm ou 227 nm ; Phase mobile avec un gradient (tableau ci-dessous) : 0.1% Acide trifluoroacétique (TFA)/Eau et 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN ; Temps de rétention du cabazitaxel = 0.97 min. Le logiciel de commande et de traitement des analyses est Empower (Waters).

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A (0.1% TFA/Eau)	%B (0.1% TFA/CH <sub>3</sub> CN)
0	0.3	30	70
1	0.3	30	70
2	0.3	0	100
4	0.3	0	100
4.2	03	30	70



Analyses élémentaires: les microanalyses (élémentaires et traces) C, H, N, Pd, S et F ont été effectuées par le service central d'analyse du CNRS à Solaize.

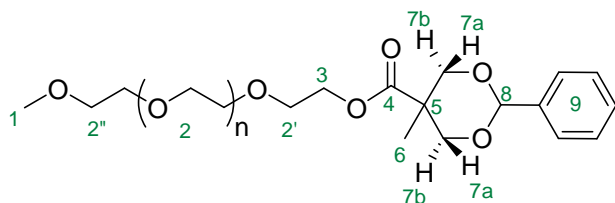
**Synthèse :*****Synthèse du 5-méthyle-2-phényle-[1, 3]dioxane-5-acide carboxylique (Bn-Bis-MPA)(I)***

L'acide 2,2'-bis(hydroxyméthyl) propionique (Bis-MPA) (10 g, 74.6 mmol), le benzaldéhyde (8.3 g, 78.2 mmol) et l'acide méthanesulfonique (AMS) (1.5 g, 15.6 mmol) sont dissouts dans 100 ml de toluène. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 5h. Le solvant est ensuite évaporé sous vide, puis une solution de  $\text{NaHCO}_3$  10% (300 ml) et de l'éther (300 ml) sont ajoutés jusqu'à dissolution complète du résidu. La phase aqueuse est récupérée, et quelques gouttes d'acide acétique glacial sont ajoutées. Après un fort dégagement gazeux, un précipité blanc se forme. Il est filtré, rincé avec 20 ml d'eau et séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 13.3\text{g}$ ,  $R = 80\%$ .

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\delta$  en ppm, Acétone  $\text{d}_6$ ) : 1.04 (s, 3H,  $-\text{C}-\text{CH}_3$ ), 3.73 (d, 2H, 1a,  $J_{\text{Ha-Hb}}^2 = 11.3$  Hz), 4.57 (d, 2H, 1b,  $J_{\text{Ha-Hb}}^2 = 11.3$  Hz), 5.52 (s, 1H,  $\text{O}_2-\text{CH}-$ ), 7.32 (m, 3H,  $\text{ArH}$ ), 7.42 (m, 2H,  $\text{ArH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\delta$  en ppm, Acétone  $\text{d}_6$ ) : 18.4 ( $-\text{CH}_3$ ), 42.8 ( $\text{Cq}$ ), 74.2 ( $-\text{CH}_2-$ ), 102.1 ( $-\text{O}_2-\text{CH}-$ ), 127.3 (CH aryle), 128.8 (CH aryle), 129.5 (CH aryle), 140.0 ( $\text{Cq}$  aryle), 176.2 ( $-\text{COOH}$ ).

Masse (DCI) : calculé pour  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$   $[\text{M} + \text{NH}_4]^+ = 240.12$  ; déterminé = 239.90

**Synthèse du méthoxy-Poly(éthylène glycol)-Benzylidène (mPEG<sub>2000</sub>-O<sub>2</sub>Bn) (II)**

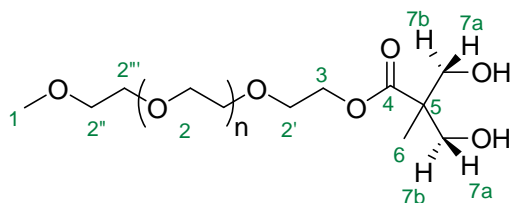
Dans un schlenk de 250 ml, le méthoxy-Poly(éthylèneglycol) 2000 g/mol (mPEG<sub>2000</sub>) (10 g, 5 mmol) et le bis-MPA protégé (**I**) (1.35 g, 6.1 mmol) sont dissouts dans 45 ml de DCM anhydre. La 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) (0.96 g, 5 mmol) et le 4-(Diméthylamino)Pyridinium *p*-Toluene-sulfonate (DPTS) (0.6 g, 2 mmol) sont ensuite ajoutés au milieu. Le milieu réactionnel est agité à 40°C, sous argon, pendant 48h. Le milieu réactionnel est ensuite extrait avec 20 ml d'une solution de HCl 1M, 20 ml d'une solution de NaHCO<sub>3</sub> 10% et 20 ml de H<sub>2</sub>O. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtration et évaporation du solvant, le résidu est précipité dans l'éther à 0°C. Puis, le précipité est filtré et séché sous vide toute la nuit. Un solide blanc est obtenu.  $M_{\text{obt}} = 9.68\text{g}$ ,  $R = 88\%$ .

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 1.05 (s, 3H, 6), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H, 2, 2' & 7b), 4.36 (t, 2H, 3,  $J^3_{H-H} = 4.8$  Hz), 4.66 (d, 2H, 7a,  $J^2_{Ha-Hb} = 11.5$  Hz), 5.44 (s, 1H, 8), 7.32 (m, 3H, ArH), 7.42 (m, 2H, ArH).

RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 17.8 (C6), 42.3 (C5), 58.9 (C1), 64.1 (C3), 68.9 (C7), 70.5 (C2), 71.8 (C2'), 73.4 (C2''), 101.2 (C8), 126.1 (CH aryle), 128.0 (CH aryle), 128.8 (CH aryle), 137.8 (Cq aryle), 173.8 (C4).

MALDI-TOF :  $M$  (g/mol) = 15 (CH<sub>3</sub>) +  $n \cdot 44$  (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) + 221 (C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>) + 23 (Na).

SEC :  $M_n = 2190$  g/mol,  $M_w = 2\,320$  g/mol, IP = 1.06

**Synthèse du méthoxy-Poly(éthylène glycol)-Diol (mPEG<sub>2000</sub>-(OH)<sub>2</sub>) (III)**

Dans un ballon schlenk Bicol de 250 ml, muni d'un ballon de baudruche rempli de dihydrogène (H<sub>2</sub>), le composé (II) (9.5g, 4.3 mmol) et le Palladium sur charbon (Pd/C 10%) (0.95g, 10% w/w) sont mélangés, suivi d'un cycle vide-argon. 40 ml de DCM et 40 ml de méthanol (MeOH) sont ensuite ajoutés. Un cycle de vide-H<sub>2</sub> est effectué. Le milieu réactionnel est agité sous H<sub>2</sub> statique à Ta pendant 4h. Ensuite, le mélange est filtré sur Célite. Les solvants sont évaporés sous vide et le résidu séché sous vide toute la nuit. Un solide jaunâtre est obtenu. M<sub>obt</sub> = 8.7g, R = 95%.

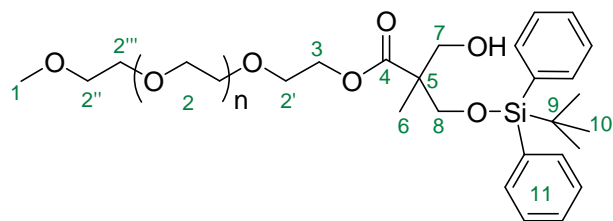
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 1.11 (s, 3H, 6), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H, 2/2'/2''/2'''), 3.69 – 3.78 (m, 4H, 7a & 7b), 4.33 (t, 2H, 3, J<sub>H-H</sub><sup>3</sup> = 4.8 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 16.9 (C6), 49.5 (C5), 58.8 (C1), 63.2 (C3), 67.1 (C7), 68.7 (C2'), 70.4 (C2), 71.8 (C2'''), 72.6 (C2''), 175.5 (C4).

SEC : M<sub>n</sub> = 2080 g/mol, M<sub>w</sub> = 2 245 g/mol, IP = 1.08

Analyse élémentaire : Calculé pour C<sub>94</sub>H<sub>188</sub>O<sub>49</sub>, C 54.07%, H 9.08%. Mesuré, C 53.53%, H 9.13%.

Analyse de traces : Pd < 2 ppm, S < 10 ppm, F 35 ppm.

**Synthèse du mPEG<sub>2000</sub>-(OH)-Y-(OTBDPS) (IV)**

Dans un schlenk de 100 ml, le composé **(III)** (4g, 1.90 mmol) est dissout dans 18 ml de DCM anhydre. La triéthylamine (TEA) distillée sur KOH (0.4g, 3.95 mmol) est ensuite ajoutée, puis le Tertio-butyle diphenyle chlorosilane (TBDPSiCl) (1.1 g, 3.92 mmol) est ajouté goutte-à-goutte à 0°C. Le milieu réactionnel est agité à 40°C et sous argon. Après 24h, le sel formé est filtré puis la phase organique est extraite avec une solution de HCl 1M (15 ml), puis une solution de NaHCO<sub>3</sub> (15 ml) et enfin H<sub>2</sub>O (15 ml). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration, le mélange est concentré sous vide, puis le résidu est précipité dans l'éther à 0°C. Le précipité blanc obtenu est alors filtré, lavé et séché sous vide. Le produit est ensuite séché à l'aide d'un azéotrope dans le toluène. Le produit est stocké dans la boîte à gants.  $M_{\text{obt}} = 4.1\text{g}$ ,  $R = 90\%$ .

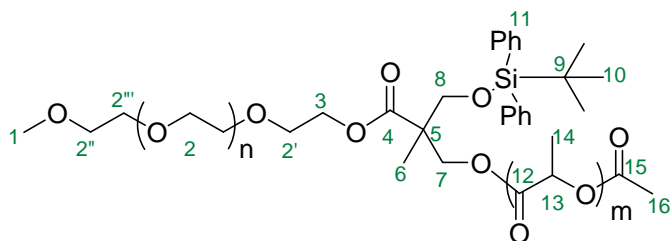
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 1.02 (s, 9H, 10), 1.19 (s, 3H, 6), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H, 2/2'/2''/2'''), 3.73 – 3.80 (m, 4H, 7 & 8), 4.26 (t, 2H, 3,  $J_{\text{H-H}}^3 = 4.8$  Hz), 7.35-7.64 (m, 10H, 11).

RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 16.9 (C6), 19.1 (C9), 26.5 (C10), 50.3 (C5), 58.7 (C1), 63.1 (C3), 65.6 (C7), 66.4 (C8), 68.6 (C2'), 70.3 (C2), 71.7 (C2'''), 72.3 (C2''), 127.5 (CH aryle), 129.5 (CH aryle), 132.9 (Cq aryle), 135.3 (CH aryle), 174.8 (C4).

RMN <sup>29</sup>Si (99.3 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : -4.33 (-O-Si-).

SEC :  $M_n = 2250$  g/mol,  $M_w = 2430$  g/mol, IP = 1.08

La protection a été faite également avec le Tris-isopropyle chlorosilane (TIPSCl).

**Synthèse du copolymère mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-OTBDPS (V)**

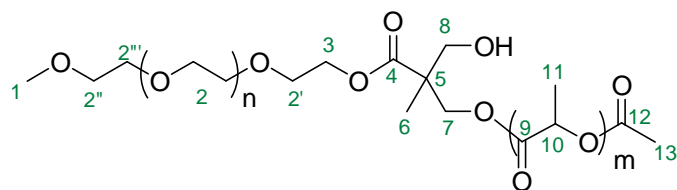
Le macroamorceur (**IV**) (0.8 g, 0.34 mmol) et le *DL*-Lactide (3.43 g, 23.8 mmol, DP 70) sont dissouts dans 14 ml de DCM anhydre. Une solution de catalyseur (10 ml, 4 équivalents de thiurée (N,N'-cyclohexyl-3,5-bis[trifluorométhyl]phényl thiourée) et 2 équivalents de (-)-spartéine) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à 35°C, sous argon, jusqu'à consommation totale du lactide, contrôlée par RMN <sup>1</sup>H. Après 6h, l'anhydride acétique (166 µl, 1.71 mmol) et la 4-Diméthylaminopyridine (DMAP) (4.5 mg, 0.35 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel. Ce dernier est agité pendant 1h supplémentaire. Le mélange est ensuite concentré sous vide, puis précipité dans 150 ml de MeOH à 0°C. Le précipité blanc formé est filtré, lavé avec 20 ml de MeOH, puis séché sous vide toute la nuit. M<sub>obt</sub> = 3.5 g, R ~ 82 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 1.02 (s, 9H, 10), 1.19 (s, 3H, 6), 1.58 (ml, 431H, 14), 2.12 (s, 3H, PLA : 16), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H, 2/2'/2''/2'''), 3.73 – 3.80 (m, 2H, 8), 4.20 – 4.40 (m, 4H, 3 & 7), 5.16 (ml, 142H, 13), 7.35-7.64 (m, 10H, 11).

RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 16.6 (C14 & C6), 20.4 (C9), 26.6 (C10), 48.5 (C5), 58.8 (C1), 63.5 (C3), 65.0 (C7), 66.6 (C8), 68.9 (C13), 68.2 (C2'), 70.1 (C2), 71.7 (C2'''), 72.2 (C2''), 127.7, 129.8, 132.8, 135.5 (C11), 169.50 (C12 & C15), 174.82 (C4).

SEC : M<sub>n</sub> = 12 900 g/mol, M<sub>w</sub> = 13 930 g/mol, IP = 1.08

La réaction de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) a été faite également avec un DP 35 et un DP 100.

**Synthèse du copolymère mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-OH (VI)**

Le copolymère (V) (3.96 g, 0.28 mmol) est dissout dans 40 ml de THF anhydre. Une solution de fluorure de tétra-butyle ammonium (TBAF) dans THF à 1 M (1.5 ml, 1.5 mmol) est ensuite ajoutée, goutte-à-goutte. Le milieu réactionnel est agité à 30°C, sous argon, pendant 7h. Ensuite, le THF est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans 15 ml de DCM, ensuite précipité dans 800 ml d'éther à 0°C. Le précipité blanc est filtré, puis séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 2.14 \text{ g}$ ,  $R = 55\%$ .

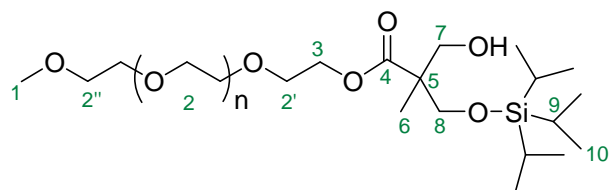
RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 1.08 (s, 3H, 6), 1.57 (ml, 418H, PLA : 11), 2.12 (s, 3H, PLA : 13), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H, 8, 2/2'/2''/2'''), 4.20 à 4.40 (m, 4H, 3 & 7), 5.15 (ml, 138H, PLA : 10).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 16.5 (PLA : C11), 48.5 (C5), 58.7 C1), 63.4 (C3), 64.2 (C7), 66.5 (C8), 68.8 (PLA : C10), 68.2 (C2'), 70.1 (C2), 71.7 (C2'''), 72.2 (C2''), 169.5 (PLA : C9), 174.8 (PEG : C4).

SEC :  $M_n = 12\,800 \text{ g/mol}$ ,  $M_w = 14\,976 \text{ g/mol}$ ,  $\text{IP} = 1.17$

Analyse élémentaire : Calculé pour  $\text{C}_{516}\text{H}_{750}\text{O}_{329}$ , C 50.80%, H 5.97%. Mesuré, C 50.54%, H 6.19%.

Analyse de traces : Pd < 2 ppm, S < 10 ppm, F 149 ppm.

**Synthèse du mPEG<sub>2000</sub>-(OH)-Y-(OTIPS) (IV')**

Dans un schlenk de 25 ml, le mPEG-Diol (0.5 g, 0.24 mmol) est dissout dans 5 ml de DCM anhydre. La triéthylamine (TEA) distillée sur KOH (0.2 g, 2.01 mmol) est ensuite ajoutée, puis le Tris-isopropyl chlorosilane (TIPSCl) (0.40 g, 2 mmol) est ajouté goutte-à-goutte à 0°C. Le milieu réactionnel est agité à 40°C et sous argon. Après 24h, le sel formé est filtré puis la phase organique est extraite avec une solution de HCl 1M (5 ml), puis une solution de NaHCO<sub>3</sub> (5 ml) et enfin H<sub>2</sub>O (5 ml). La phase organique est séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration, le mélange est concentré sous vide, puis le résidu est précipité dans l'éther à 0°C. Le précipité blanc obtenu est alors filtré, lavé et séché sous vide. Le produit est ensuite séché à l'aide d'un azéotrope dans le toluène. Le produit est stocké dans la boîte à gants.  $M_{\text{obt}} = 0.4$  g, R = 74 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 0.98 -1.03 (ml, 21H, 9 & 10), 1.16 (s, 3H, 6), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (m, 180H, 2/2'/2''), 3.60 – 3.80 (dd, 2H, J = 11.1 & 55.8 Hz, AB, 7), 3.85 – 3.92 (dd, 2H, J = 9.4 & 24.7 Hz, AB, 8), 4.26 (t, 2H, J<sup>3</sup><sub>H-H</sub> = 4.8 Hz, 3).

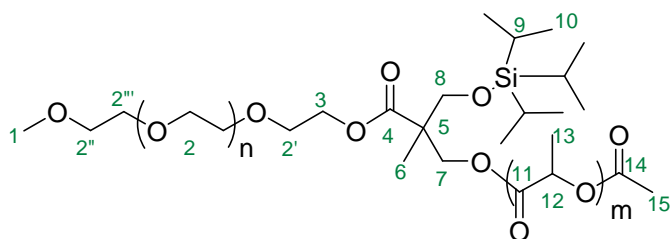
RMN <sup>13</sup>C (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 11.7 (C9), 17.3 (C6), 17.8 (C10), 50.3 (C5), 58.9 (C1), 63.1 (C3), 66.1 (C7), 66.8 (C8), 68.7 (C2'), 70.4 (C2), 71.8 (C2''), 174.8 (C4).

RMN <sup>29</sup>Si (99.3 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : -22.00 (-O-Si-).

MALDI-TOF : M (g/mol) = 15 (CH<sub>3</sub>) + n \* 44 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O) + 289 (C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>O<sub>4</sub>Si) + 23 (Na).

SEC : M<sub>n</sub> = 2 100 g/mol, M<sub>w</sub> = 2 289 g/mol, IP = 1.09



**Synthèse du copolymère mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-OTBDPS (V')**

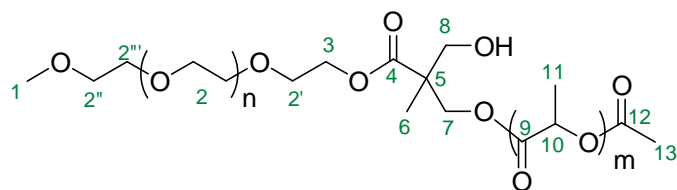
Le macroamorceur (0.18 g, 79.6  $\mu\text{mol}$ ) et le *DL*-Lactide (0.8 g, 5.6 mmol, DP 70) sont dissouts dans 7 ml de DCM anhydre. Une solution de catalyseur (1 ml, 4 équivalents de thiurée (N,N'-cyclohexyl-3,5-bis[trifluorométhyl]phényl thiourée) et 2 équivalents de (+)-spartéine) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à 35°C, sous argon, jusqu'à consommation totale du lactide, contrôlée par RMN  $^1\text{H}$ . Après 3h, l'anhydride acétique (39  $\mu\text{l}$ , 0.40 mmol) et la 4-Diméthylaminopyridine (DMAP) (10 mg, 82  $\mu\text{mol}$ ) sont ajoutés au milieu réactionnel. Ce dernier est agité pendant 1h supplémentaire. Le mélange est ensuite concentré sous vide, puis précipité dans 50 ml d'éther 0 °C. Le précipité blanc formé est filtré, lavé avec 20 ml de MeOH, puis séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 1 \text{ g}$ ,  $R \sim 75 \%$ .

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 0.98 -1.03 (ml, 21H), 1.16 (s, 3H), 1.58 (ml, 423H), 2.12 (s, 3H), 3.37 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 180H), 3.73 – 3.80 (m, 2H), 4.20 – 4.40 (m, 4H), 5.16 (ml, 141H, 13).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 11.8 (C9), 16.5 (C13 & C6), 17.8 (C10), 48.5 (C5), 58.8 (C1), 63.5 (C3), 65.0 (C7), 66.7 (C8), 68.1 (C2'), 68.8 (C12), 70.1 (C2), 71.8 (C2''), 72.2 (C2'''), 169.50 (C11 & C14), 174.9 (C4).

SEC :  $M_n = 11\,850 \text{ g/mol}$ ,  $M_w = 13\,628 \text{ g/mol}$ ,  $\text{IP} = 1.15$

La réaction de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) a été faite également avec un DP 35 et un DP 100.

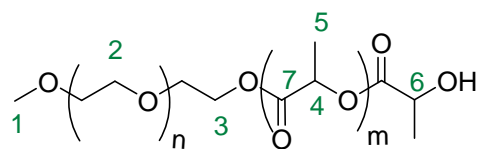
**Synthèse du copolymère mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-OH (VI')**

Le copolymère protégé (1 g, 71  $\mu$ mol) est dissout dans 10 ml de DCM anhydre.  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0.5 g, 3.56 mmol) est ensuite ajouté, goutte-à-goutte, à 0 °C. Le milieu réactionnel est agité à 0 °C, sous argon, pendant 1h, ensuite à 30 °C pendant 19h. Puis, le DCM est évaporé sous vide. Le résidu est solubilisé dans 5 ml de DCM, ensuite précipité dans 50 ml d'éther à 0°C, lavé avec 20 ml de MeOH puis 20 ml de pentane. Le précipité blanc est filtré, puis séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 0.85$  g, R ~ 85%.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 1.09 (s, 3H), 1.58 (ml, 425H), 2.12 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 3.63 (ml, 180H), 4.33 (m, 4H), 5.16 (ml, 142H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 16.5 (PLA : C11), 48.5 (C5), 58.7 (C1), 63.4 (C3), 64.2 (C7), 66.5 (C8), 68.8 (PLA : C10), 68.2 (C2'), 70.1 (PEG : C2), 71.7 (C2'''), 72.2 (C2''), 169.5 (PLA : C9), 174.8 (PEG : C4).

SEC :  $M_n = 11\,800$  g/mol,  $M_w = 13\,925$  g/mol, IP = 1.18

**Synthèse du copolymère mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-OH (L1)**

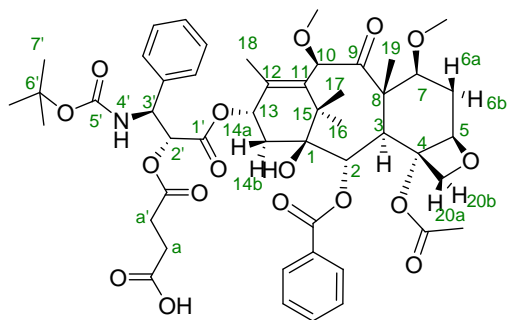
Le macroamorceur mPEG-OH (2000 g/mol) (0.35 g, 175  $\mu$ mol) et le *DL*-Lactide (1.75 g, 12.2 mmol, DP 70) sont dissouts dans 10 ml de DCM anhydre. Une solution de catalyseur (2.2 ml, 4 équivalents de thiurée (N,N'-cyclohexyl-3,5-bis[trifluorométhyl]phényl thiourée) et 2 équivalents de (+)-spartéine) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à 35°C, sous argon, jusqu'à consommation totale du lactide, contrôlée par RMN  $^1\text{H}$ . Après 1h, le mélange est concentré sous vide, puis précipité dans 100 ml d'éther 0 °C. Le précipité blanc formé est filtré, lavé avec 40 ml de MeOH, puis séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 1.8$  g, R ~ 85 %.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 1.57 (ml, 415H, 5), 3.33 (s, 3H, 1), 3.63 (ml, 175H, 2), 4.20 – 4.30 (m, 2H, 3), 4.4 (q, 1H, 6), 5.16 (ml, 137H, 4).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 16.5 (PLA : C5), 58.8 (C1), 64.2 (C3), 69.1 (PLA : C4), 70.1 (C2), 167.0 (PLA : C7).

SEC :  $M_n = 11\,700$  g/mol,  $M_w = 13\,455$  g/mol, IP = 1.15

La réaction de polymérisation par ouverture de cycle (ROP) a été faite également avec un DP 35 et un DP 100.

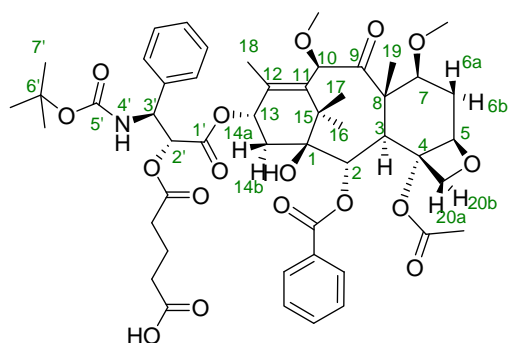
**Synthèse du Succinyl-2'-Cabazitaxel (VII)**

Dans un ballon de 100 ml sont ajoutés sous argon, 2 g (2.25 mmol) de cabazitaxel acétone solvate, 40 ml de dichloromethane, 2.5 g (22.49 mmol) d'anhydride succinique et 0.03 g (0.23 mmol) de DMAP. La solution est chauffée à 30°C toute la nuit puis lavée plusieurs fois avec 20 ml d'eau. Après séchage de la phase organique avec  $\text{MgSO}_4$ , la solution est concentrée à sec à 40°C sous vide. Le résidu sec est traité avec 10 volumes de diisopropyl éther et la suspension est filtrée et le solide lavé 2 fois avec 2 volumes de diisopropyl éther. Après séchage à Ta sous vide, 1.8 g de poudre blanche est obtenu. R = 85%.

**RMN  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 1.19 (s, 3H, 16), 1.20 (s, 3H, 17), 1.35 (s, 9H, 7'), 1.63 (s, 1H, -OH tertiaire), 1.70 (s, 3H, 19), 1.78 (m, 1H, 6a), 1.86 (s, 3H, 18), 2.15 (s, 6H, - $\text{CH}_3$  acétone), 2.18 – 2.33 (m, 2H, 14a & 14b), 2.34 (s, 3H, - $\text{CH}_3$  acétyle en 4), 2.65 (m, 5H, - $\text{CH}_2$  succinique a, a' & 6b), 3.28 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$  en 7), 3.44 (s, 3H, - $\text{OCH}_3$  en 10), 3.80 (d, 1H, 3,  $J = 7.5$  Hz), 3.84 (dd, 1H, 7,  $J = 6.5$  & 10.5 Hz), 4.16 (d, 1H, 20a,  $J = 8.5$  Hz), 4.28 (d, 1H, 20b,  $J = 8.5$  Hz), 4.80 (s, 1H, 10), 4.95 (d, 1H, 5,  $J = 10$  Hz), 5.28 - 5.44 (ml, 2H, 2'/4'), 5.61 (d, 1H, 2,  $J = 7.5$  Hz), 6.19 (b, 1H, 13), 7.31, 7.38, 7.47, 7.59, (m, 9H, ArH), 8.10 (d, 2H, H ortho benzoate).

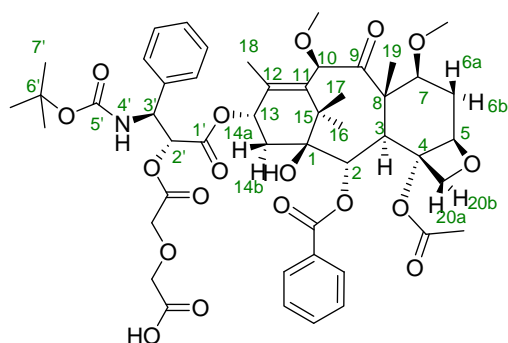
**RMN  $^{13}\text{C}$**  (75.5 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 10.3 (C19), 14.4 (C18), 20.9 (C16), 22.7 ( $\text{CH}_3$  acétyle), 26.7 (C17), 28.3-28.6 (- $\text{CH}_2$  succinique a & a'), 28.1 (C7'), 31.9 (C6), 34.9 (C14), 43.3 (C15), 47.3 (C3), 56.7 (C8), 57.1 (C3',  $\text{OCH}_3$  en C7 &  $\text{OCH}_3$  en C10), 72.4 (C13), 74.7 (C2'), 74.9 (C2), 76.4 (C20), 78.8 (C1), 80.6 (C7), 81.5 (C6' & C4), 82.5 (C10), 84.1 (C5), 126.3-133.8 (Ar), 135.1 (C11), 139.3 (C12), 155.5 (C5'), 166.9 (CO benzoate), 167.9 (CO acétyle en C4), 170.0 - 174.0 (C1', -COO- succiniques), 204.9 (C9).

**Masse (ESI)** :  $[\text{C}_{49}\text{H}_{61}\text{NO}_{17} + \text{Na}]^+$ , calculé = 958.38 ; mesuré = 958.50

**Synthèse du Glutaryl-2'-Cabazitaxel**

Dans un ballon de 500 ml sont ajoutés sous argon, 10 g (11.24 mmol) de cabazitaxel acétone solvate, 200 ml de dichlorométhane, 13.51 g (112.45 mmol) d'anhydride glutarique et 0.14 g (1.12 mmol) de DMAP. La solution est chauffée à 30°C toute la nuit puis lavée plusieurs fois avec 100 ml d'eau. Après séchage de la phase organique avec  $\text{MgSO}_4$ , la solution est concentrée à sec à 40°C sous vide. Le résidu sec est traité avec 10 volumes de diisopropyl éther et la suspension est filtrée et le solide lavé 2 fois avec 2 volumes de diisopropyl éther. Après séchage à Ta sous vide, 6.75 g de poudre blanche est obtenu. R = 63 %.

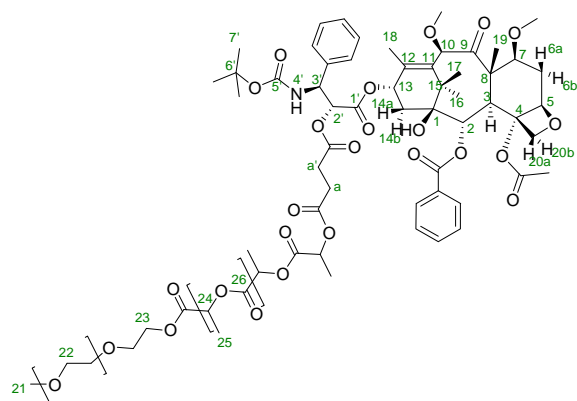
RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 0.97 (s, 3 H), 0.98 (s, 3 H), 1.38 (s, 9 H), 1.50 (m, 5 H), 1.79 (m, 6 H), 2.24 (s, 3 H), 2.28 (t,  $J=7.3$  Hz, 2 H), 2.46 (t,  $J=7.4$  Hz, 2 H), 2.66 (m, 1 H), 3.21 (s, 3 H), 3.29 (s, 3 H), 3.59 (d,  $J=7.1$  Hz, 1 H), 3.75 (dd,  $J=6.6$  et 10.7 Hz, 1 H), 4.02 (s, 2 H), 4.47 (s, 1 H), 4.70 (s, 1 H), 4.95 (dl,  $J=10.7$  Hz, 1 H), 5.02 à 5.12 (m, 2 H), 5.37 (d,  $J=7.1$  Hz, 1 H), 5.81 (ml,  $J=9.0$  Hz, 1 H), 7.18 (t,  $J=7.7$  Hz, 1 H), 7.36 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.43 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.66 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.74 (t,  $J=7.7$  Hz, 1 H), 7.85 (dl,  $J=9.1$  Hz, 1 H), 7.98 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 12.13 (ml, 1 H).

**Synthèse *n* du Diglycolyl-2'-Cabazitaxel**

Dans un ballon de 250 ml sont ajoutés sous argon, 5 g (5.62 mmol) de cabazitaxel acétone solvate, 100 ml de dichloromethane, 6.53 g (56.22 mmol) d'anhydride diglycolique et 0.107 g (0.56 mmol) de DMAP. La solution est chauffée à 22°C toute la nuit puis lavée 2 fois avec 50 ml d'eau. Après séchage de la solution organique avec  $\text{MgSO}_4$ , la solution est concentrée à sec à 40°C sous vide. L'extrait sec est traité avec 4 volumes de diisopropyl éther et la suspension est agitée 30 minutes puis filtrée et le solide lavé 2 fois avec 2 volumes of diisopropyl éther. Après séchage à 40°C sous vide, 5.04 g de poudre blanche est obtenu. R = 94 %.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ): 0.96 (s, 3 H), 0.98 (s, 3 H), 1.37 (m, 9 H), 1.44 à 1.58 (m, 2 H), 1.51 (s, 3 H), 1.80 (sl, 4 H), 2.23 (s, 3 H), 2.67 (m, 1 H), 3.21 (s, 3 H), 3.28 (s, 3 H), 3.58 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 3.75 (dd,  $J=6.8$  & 10.5 Hz, 1 H), 4.02 (s, 2 H), 4.13 (s, 2 H), 4.31 (d,  $J=17.0$  Hz, 1 H), 4.38 (d,  $J=17.0$  Hz, 1 H), 4.51 (s, 1 H), 4.70 (s, 1 H), 4.95 (d,  $J=10.5$  Hz, 1 H), 5.06 (m, 1 H), 5.16 (d,  $J=8.5$  Hz, 1 H), 5.37 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 5.82 (tl,  $J=9.4$  Hz, 1 H), 7.19 (t,  $J=7.8$  Hz, 1 H), 7.36 (d,  $J=7.8$  Hz, 2 H), 7.43 (t,  $J=7.8$  Hz, 2 H), 7.66 (t,  $J=7.8$  Hz, 2 H), 7.73 (t,  $J=7.8$  Hz, 1 H), 7.88 (d,  $J=9.3$  Hz, 1 H), 7.97 (d,  $J=7.8$  Hz, 2 H), 12.78 (ml, 1 H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 10.3 (C19), 14.4 (C18), 20.9 (C16), 22.7 ( $\text{CH}_3$  acétyle), 26.7 (C17), 28.1 (C7'), 31.9 (C6), 34.9 (C14), 43.3 (C15), 47.3 (C3), 56.8 (C8), 57.0 à 57.2 (C3',  $\text{OCH}_3$  en C7 &  $\text{OCH}_3$  en C10), 67.7 ( $-\text{CH}_2\text{OCH}_2-$  diglycolique), 72.4 (C13), 74.7 (C2'), 74.9 (C2), 76.4 (C20), 78.8 (C1), 80.6 (C7), 81.5 (C6' & C4), 82.4 (C10), 84.1 (C5), 126.3-133.6 (Ar), 135.1 (C11), 139.2 (C12), 155.1 (C5'), 167.0 (CO benzoate), 168.0 (CO acétyle en C4), 169.5 ( $-\text{COO}-$  diglycolique), 176.9 (C1'), 205.0 (C9).

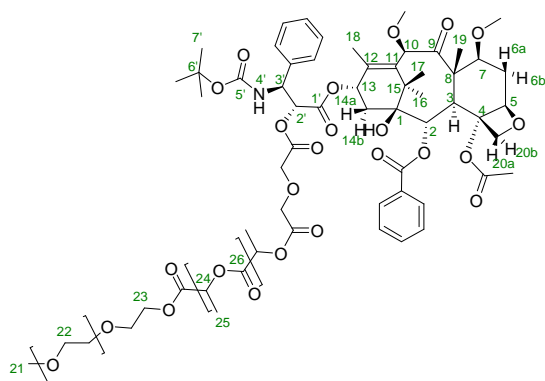
**Synthèse du conjugué linéaire mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Succinyl-Cabazitaxel (L2)**

Dans un ballon de 50 ml sont ajoutés sous argon, 1 g de copolymère mPEG-PLA-OH (L1) (86.7  $\mu\text{mol}$ ), 150 mg (1.85  $\text{eq.}$ ) de succinyl-cabazitaxel dans 10 ml de DCM. Ensuite, 22 mg (2.1  $\text{eq.}$ ) de DMAP et 22.8 mg (2.1  $\text{eq.}$ ) de DIPC sont ajoutés. La solution est agitée pendant 24 h à 35°C. La phase organique est concentrée et l'extrait est précipité dans 200 ml de méthanol à 0 °C. La suspension est filtrée et le solide est lavé avec 3 \* 50 ml de pentane, ensuite séché à Ta sous vide pour obtenir 950 mg du produit désiré. R ~ 88 %.

RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ): 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.35 (s, 9 H), 1.40 à 1.70 (ml, 412 H), 1.72 (s, 3 H), 1.80 (m, 1 H), 2.01 (s, 3 H), 2.20 (m, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.45 (sl, 3 H), 2.65 à 2.85 (m, 5 H), 3.30 (s, 3 H), 3.36 (s, 3 H), 3.44 (s, 3 H), 3.48 à 3.81 (ml, 175 H), 3.80 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 3.86 (dd,  $J=6.6$  & 11.0 Hz, 1 H), 4.15 à 4.40 (m, 4 H), 4.83 (s, 1 H), 5.01 (d,  $J=10.7$  Hz, 1 H), 5.03 à 5.33 (ml, 138 H), 5.40 à 5.55 (m, 3 H), 5.68 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 6.29 (tl, 1 H), 7.30 (m, 3 H), 7.40 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.50 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.60 (t,  $J=7.7$  Hz, 1 H), 8.12 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ) : 10.8 (C19), 15.2 (C18), 16.6 (PLA : C25), 21.2 (C16), 23.2 ( $\text{CH}_3$  acétyle en C4), 27.3 (C17), 26.7 et 28.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  succinique a & a'), 28.7 (C7'), 32.6 (C6), 35.7 (C14), 43.8 (C15), 47.9 (C3), 56.7 (C3'), 57.4 (C8), 57.5 ( $\text{OCH}_3$  en C7), 57.8 ( $\text{OCH}_3$  en C10), 58.8 (C21), 64.2 (C23), 69.1 (PLA : C24), 70.1 (PEG : C22), 73.1 (C13), 74.7 (C2'), 75.0 (C2), 77.0 (C20), 79.2 (C1), 80.7 (C7), 81.2 (C6'), 82.3 (C4), 83.1 (C10), 84.6 (C5), 127.3-138.9 (Ar), 136.2 (C11), 139.1 (C12), 155.8 (C5'), 167.0 (PLA : C26 & CO benzoate), 168.7 (CO acétyle en C4), 170.0 - 174.0 (C1',  $-\text{COO}-$  succiniques), 205.5 (C9).

SEC:  $M_n = 10\,970$  g/mol,  $M_w = 12\,615$  g/mol, IP = 1.15

**Synthèse du conjugué linéaire mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-diglycolyl-Cabazitaxel (L3)**

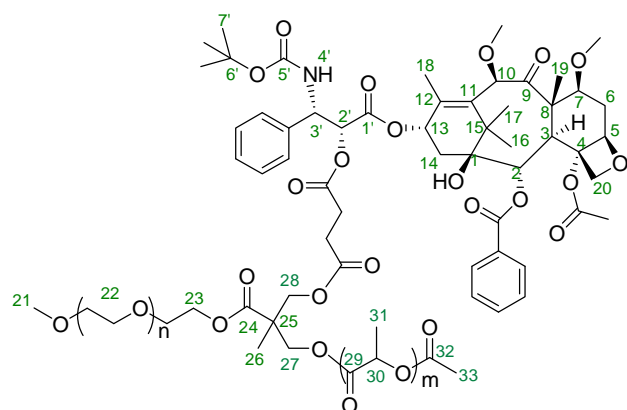
Dans un ballon de 25 ml sont ajoutés sous argon, 0.2g de copolymère mPEG-PLA-OH (L1) (0.0163 mmol), 34.0 mg (2.15 éq.) de diglycolyl-cabazitaxel dans 4 ml de DCM. Ensuite, 5 mg (2.5 eq.) de DMAP et 4.4 mg (2.13 eq.) de DIPC sont ajoutés. La solution est agitée pendant 24 h à 35°C. La phase organique est concentrée et l'extrait est précipité dans 40 ml de méthanol à 0 °C. La suspension est filtrée et le solide est lavé avec 3 \* 10 ml de pentane, ensuite séché à Ta sous vide pour obtenir 170 mg du produit désiré. R ~ 85 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d): 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.35 (s, 9 H), 1.40 à 1.70 (ml, 412 H), 1.72 (s, 3 H), 1.80 (m, 1 H), 2.01 (s, 3 H), 2.20 (m, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.45 (sl, 3 H), 2.71 (m, 1 H), 3.30 (s, 3 H), 3.36 (s, 3 H), 3.44 (s, 3 H), 3.48 à 3.81 (ml, 175 H), 3.80 (d, *J*=7.3 Hz, 1 H), 3.86 (dd, *J*=6.6 & 11.0 Hz, 1 H), 4.08 à 4.40 (m, 8 H), 4.83 (s, 1 H), 5.01 (d, *J*=10.7 Hz, 1 H), 5.03 à 5.33 (ml, 138 H), 5.40 à 5.55 (m, 3 H), 5.68 (d, *J*=7.3 Hz, 1 H), 6.29 (tl, 1 H), 7.30 (m, 3 H), 7.40 (t, *J*=7.7 Hz, 2 H), 7.50 (t, *J*=7.7 Hz, 2 H), 7.60 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H), 8.12 (d, *J*=7.7 Hz, 2 H).

RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d) : 10.3 (C19), 14.4 (C18), 16.3 (PLA : C25), 20.9 (C16), 22.7 (CH<sub>3</sub> acétyle en C4), 26.7 (C17), 28.1 (C7'), 31.9 (C6), 34.9 (C14), 43.3 (C15), 47.3 (C3), 56.8 (C8), 57.0 à 57.2 (C3', OCH<sub>3</sub> en C7 & OCH<sub>3</sub> en C10), 58.3 (C21), 63.8 (C23), 67.5 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- diglycolique), 69.1 (PLA : C24), 70.1 (PEG : C22), 72.4 (C13), 74.7 (C2'), 74.9 (C2), 76.4 (C20), 78.8 (C1), 80.6 (C7), 81.5 (C6' & C4), 82.4 (C10), 84.1 (C5), 126.3-133.6 (Ar), 135.1 (C11), 139.2 (C12), 155.1 (C5'), 167.0 (PLA : C26 & CO benzoate), 168.0 (CO acétyle en C4), 169.2 (-COO- diglycolique), 176.9 (C1'), 205.0 (C9).

SEC: M<sub>n</sub> = 11 800 g/mol, M<sub>w</sub> = 13 250 g/mol, IP = 1.12



**Synthèse du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-Succinyl-2'-Cabazitaxel (VIII)**

Le copolymère (VI') (2 g, 163  $\mu\text{mol}$ ) et le Succinyl-2'-Cabazitaxel (VII) (0.33 g, 353  $\mu\text{mol}$ ) sont dissouts dans 40 ml de DCM anhydre. La N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIPC) (45 mg, 357  $\mu\text{mol}$ ) puis la DMAP (45 mg, 368  $\mu\text{mol}$ ) sont ensuite ajoutés. Le milieu réactionnel est agité à 35°C, sous argon, pendant 24h. La phase organique est ensuite concentrée sous vide, puis précipitée dans 400 mL de MeOH. Après filtration, le précipité est lavé deux fois avec 200 mL de pentane puis séché sous vide toute la nuit.  $M_{\text{obt}} = 1.5 \text{ g}$ ,  $R = 75\%$ .

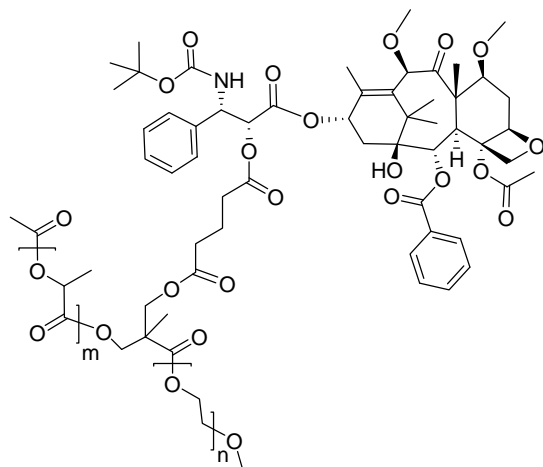
**RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ):** 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.26 (m, 3 H), 1.35 (s, 9 H), 1.40 à 1.70 (ml, 430 H), 1.72 (s, 3 H), 1.80 (m, 1 H), 2.01 (s, 3 H), 2.13 (s, 3 H), 2.21 (m, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.45 (s, 3 H), 2.71 (m, 5 H), 3.31 (s, 3 H), 3.38 (s, 3 H), 3.45 (s, 3 H), 3.48 à 3.81 (ml, 180 H), 3.86 (d,  $J=7.3 \text{ Hz}$ , 1 H), 3.91 (dd,  $J=6.6 \text{ \& } 11.0 \text{ Hz}$ , 1 H), 4.08 à 4.40 (m, 4 H), 4.83 (s, 1 H), 5.02 (d,  $J=10.7 \text{ Hz}$ , 1 H), 5.03 à 5.33 (ml, 141 H), 5.40 à 5.57 (m, 3 H), 5.67 (d,  $J=7.3 \text{ Hz}$ , 1 H), 6.29 (tl,  $J=9.0 \text{ Hz}$ , 1 H), 7.31 (m, 3 H), 7.40 (t,  $J=7.7 \text{ Hz}$ , 2 H), 7.50 (t,  $J=7.7 \text{ Hz}$ , 2 H), 7.60 (t,  $J=7.7 \text{ Hz}$ , 1 H), 8.11 (d,  $J=7.7 \text{ Hz}$ , 2 H).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3\text{-d}$ ):** 10.8 (C19), 15.2 (C18), 16.5 (PLA : C31), 21.2 (C16), 23.2 ( $\text{CH}_3$  acétyle en C4), 27.3 (C17), 26.7 et 28.1 ( $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  succinique a & a'), 28.7 (C7'), 32.6 (C6), 35.7 (C14), 43.8 (C15), 47.9 (C3), 48.5 (C25), 56.7 (C3'), 57.4 (C8), 57.5 ( $\text{OCH}_3$  en C7), 57.8 ( $\text{OCH}_3$  en C10), 58.7 (C21), 63.2 (C23), 64.5 (C27 & C28), 69.1 (PLA : C30), 70.1 (PEG : C22), 73.1 (C13), 74.7 (C2'), 75.0 (C2), 76.5 (C20), 79.2 (C1), 80.7 (C7), 81.2 (C6'), 82.3 (C4), 83.1 (C10), 84.6 (C5), 127.2-139.0 (Ar), 136.2 (C11), 139.1 (C12), 155.8 (C5'), 167.0 (CO benzoate), 168.7 (CO acétyle en C4), 169.5 (PLA : C29 &  $-\text{COO}-$  succiniques), 174.8 (PEG : C24), 176.9 (C1'), 205.5 (C9).

**SEC:**  $M_n = 12\,130 \text{ g/mol}$ ,  $M_w = 13\,585 \text{ g/mol}$ ,  $\text{IP} = 1.12$ .

Analyse élémentaire : Calculé pour  $C_{565}H_{809}NO_{345}$ , C 51.26%, H 6.05%, N 0.08%. Mesuré, C 49.33%, H 5.84%, N < 0.1%.

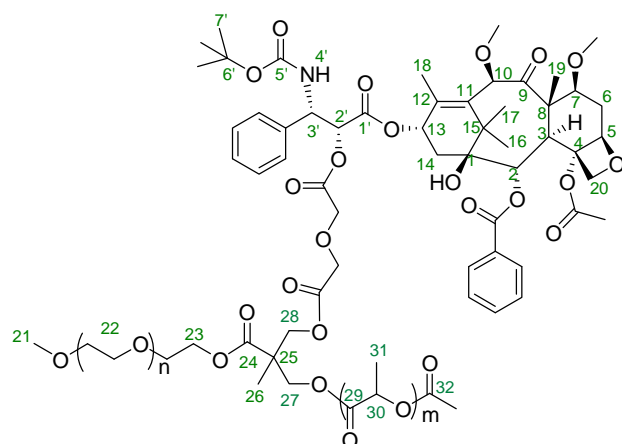
Analyse de traces : Pd < 2 ppm, S < 10 ppm, F 74 ppm.

**Synthèse du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-glutaryl-cabazitaxel (X)**

Dans un ballon de 25 ml sont ajoutés sous argon, 0.2 g de copolymère mPEG-PLA-Y-OH (VI') (0.0157 mmol), 31.6 mg (2.2 eq) de glutaryl-cabazitaxel dans 4 ml de DCM ensuite 100 mg de tamis moléculaire en poudre 4Å activé. Après 10 min d'agitation, sont ajoutés 4.4 mg (2.3 eq.) de DMAP et 4.3 mg (2.2 eq.) de DIPC. La suspension est agitée pendant 24 h à 35°C puis filtrée (0.22 microns). La phase organique est concentrée à sec et l'extract est traité avec 40 ml de méthanol de 2 gouttes de dichlorométhane. La suspension est agitée pendant 2 h à Ta, puis filtrée et le solide séché à Ta sous vide pour obtenir 170 mg du produit attendu. R ~ 80 %.

**RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz,  $\delta$  en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d): 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.25 (m, 3 H), 1.35 (s, 9 H), 1.40 à 1.70 (ml, 452 H), 1.72 (s, 3 H), 1.80 (m, 1 H), 1.87 (m, 2 H), 2.00 (s, 3 H), 2.13 (s, 3 H), 2.15 à 2.51 (m, 6 H), 2.45 (s, 3 H), 2.71 (m, 1 H), 3.32 (s, 3 H), 3.39 (s, 3 H), 3.45 (s, 3 H), 3.48 à 3.81 (ml, 172 H), 3.86 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 3.91 (dd,  $J=6.3$  & 11.0 Hz, 1 H), 4.10 à 4.40 (m, 8 H), 4.83 (s, 1 H), 5.00 (d,  $J=10.7$  Hz, 1 H), 5.01 à 5.33 (ml, 152 H), 5.35 (m, 1 H), 5.44 à 5.63 (m, 2 H), 5.66 (d,  $J=7.3$  Hz, 1 H), 6.27 (tl,  $J=9.0$  Hz, 1 H), 7.32 (m, 3 H), 7.40 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.50 (t,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.61 (t,  $J=7.7$  Hz, 1 H), 8.12 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H).

**SEC:**  $M_n = 11\,210$  g/mol,  $M_w = 14\,140$  g/mol, IP = 1.26

**Synthèse du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-diglycolyl-cabazitaxel (XI)**

Dans un ballon de 25 ml sont ajoutés sous argon, 0.2g de copolymère mPEG-PLA-Y-OH (VI') (0.0157 mmol), 32.3 mg (2.2 eq) de diglycolyl-cabazitaxel dans 4 ml de DCM puis 100 mg de tamis moléculaire en poudre 4Å activé. Après 10 min d'agitation, est ajouté 4.4 mg (2.3 eq.) de DMAP et 4.3 mg (2.2 eq.) de DIPC. La suspension est agitée pendant 24 h à 35°C puis filtrée (0.22 microns). La phase organique est concentrée à sec et l'extrait est traité avec 40 ml de méthanol et 2 gouttes de dichlorométhane. La suspension est agitée pendant 2 h à Ta, puis filtrée et le solide séché à Ta sous vide pour obtenir 184 mg du produit obtenu (R ~ 92 %).

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d):** 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.26 (m, 3 H), 1.35 (s, 9 H), 1.40 à 1.70 (ml, 486 H), 1.72 (s, 3 H), 1.80 (m, 1 H), 2.01 (sl, 3 H), 2.13 (s, 3 H), 2.21 (m, 1 H), 2.32 (m, 1 H), 2.45 (sl, 3 H), 2.71 (m, 1 H), 3.31 (s, 3 H), 3.38 (s, 3 H), 3.45 (s, 3 H), 3.48 à 3.81 (ml, 180 H), 3.86 (d, *J*=7.3 Hz, 1 H), 3.91 (dd, *J*=6.6 & 11.0 Hz, 1 H), 4.08 à 4.40 (m, 8 H), 4.83 (s, 1 H), 5.02 (d, *J*=10.7 Hz, 1 H), 5.03 à 5.33 (ml, 162 H), 5.40 à 5.57 (m, 3 H), 5.67 (d, *J*=7.3 Hz, 1 H), 6.29 (tl, *J*=9.0 Hz, 1 H), 7.31 (m, 3 H), 7.40 (t, *J*=7.7 Hz, 2 H), 7.50 (t, *J*=7.7 Hz, 2 H), 7.60 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H), 8.11 (d, *J*=7.7 Hz, 2 H).

**RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>-d):** 8.4 (C19), 15.2 (C18), 16.6 (PLA : C31), 19.4 (C16), 24.9 (CH<sub>3</sub> acétyle en C4), 28.1 (C17), 28.7 (C7'), 32.6 (C6), 35.9 (C14), 41.5 (C15), 47.8 (C3), 48.3 (C25), 56.7 (C3'), 57.4 (C8), 57.5 (OCH<sub>3</sub> en C7), 57.8 (OCH<sub>3</sub> en C10), 58.7 (C21), 63.1 (C23), 63.3 (C27 & C28), 68.5 (-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>- diglycolique), 69.1 (PLA : C30), 70.1 (PEG : C22), 71.9 (C13), 74.6 (C2'), 75.0 (C2), 78.9 (C1), 80.11 (C7), 81.6 (C6'), 82.5 (C4), 83.2 (C10), 84.1 (C5), 126.3-130.1 (Ar), 135.5 (C11), 140.8 (C12), 157.5 (C5'), 163.0

(CO benzoate), 168.5 (CO acétyle en C4), 169.5 (PLA : C29 & -COO- diglycolique), 173.9 (PEG : C24), 176.9 (C1'), 207.2 (C9).

SEC:  $M_n = 11\,920$  g/mol,  $M_w = 14\,830$  g/mol,  $IP = 1.24$



### ***Chapitre III : Préparation et Evaluation des Nanoparticules***





## I. Introduction

Nous rappelons que les conjugués polymériques linéaires et de structure Y, dont la préparation est décrite dans le Chapitre II, se différencient par la position du cabazitaxel. Dans le cas des conjugués de structure Y, le cabazitaxel est positionné entre la chaîne hydrophile de PEG et la chaîne hydrophobe de PLA. A notre connaissance, ce type de structure n'a jamais été décrit auparavant. En revanche, dans le cas des conjugués linéaires, le cabazitaxel est accroché à l'extrémité de chaîne de PLA. Cette position en bout de chaîne de PLA est la plus connue dans la littérature (cf. Chapitre I).

Toute la question ici est de savoir si la position du cabazitaxel au sein du conjugué Y ne perturbe pas d'une part la formation de nanoparticules stables par auto-assemblage comme ce qui est décrit pour les conjugués linéaires,<sup>[1;2]</sup> et offre d'autre part une distribution du principe actif au sein des nanoparticules qui se distinguent de celle des conjugués linéaires (une répartition plus proche de la surface des nanoparticules). Il est donc important de mener une étude comparative entre les deux types de structures afin d'explorer l'influence de la position du cabazitaxel sur la formulation de nanoparticules. Cette étude comparative concernera les propriétés physico-chimiques des formulations : la taille, la morphologie, la charge de surface, la concentration micellaire critique, la stabilité et la localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules.

La distribution du principe actif au sein des nanoparticules pourrait avoir une influence sur la vitesse de libération. Cheng *et al.*<sup>[3;4]</sup> ont utilisé la microscopie de Diffusion Anti-Stokes Raman stimulée (CARS de l'anglais « *Coherent Anti-Stokes Raman Scattering* ») pour visualiser *in situ* la distribution et la libération du paclitaxel encapsulé dans des films de PLGA de quelques dizaines de  $\mu\text{m}$ . Ces études ont pu démontrer que plus le paclitaxel est proche de la surface du film polymérique plus sa libération est rapide. En revanche, à notre connaissance, ce phénomène n'a jamais été exploré dans le cas des nanoparticules polymériques. L'utilisation de la microscopie CARS, étant limitée par une résolution latérale de l'ordre de  $0.3\ \mu\text{m}$  et une résolution en profondeur de  $0.9\ \mu\text{m}$ ,<sup>[4]</sup> ne permettrait pas de visualiser le principe actif au sein des nanoparticules dont le diamètre est inférieur à  $100\ \text{nm}$ .

Après avoir vérifié la stabilité des deux familles de nanoparticules (de conjugués linéaires et Y) et les différences en terme de répartition du PA au sein des nanoparticules, il sera important d'étudier l'effet de cette ingénierie nanoparticulaire sur les propriétés de libération du PA. Comme cela a été expliqué précédemment, la libération du PA encapsulé de manière

covalente est gouvernée essentiellement par l'accessibilité de la liaison « polymère-PA » à l'hydrolyse chimique et/ou enzymatique, par la nature de l'espaceur, par la dégradation de la matrice polymérique et par la diffusion du PA. L'enjeu est donc d'étudier l'influence de la répartition du PA sur ces paramètres clés. Il faudrait ainsi vérifier si un positionnement du PA proche de la surface des nanoparticules permettrait d'une part d'améliorer l'accessibilité du PA au clivage (chimique et/ou enzymatique) et d'autre part de faciliter sa diffusion vers le milieu aqueux. Après localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules de conjugués linéaires et de structure Y à l'aide d'une technique adéquate, l'influence de cette position sur le profil de libération *in vitro* sera étudiée.

Comme nous l'avons reporté dans le Chapitre II, la nature de l'espaceur influence également le profil de libération du principe actif. Dans le cas des espaceurs dicarboxyliques, la vitesse de libération semble augmenter avec la longueur de l'espaceur et avec son hydrophilie.<sup>[5;6]</sup> Dans cette logique, l'influence de la nature de l'espaceur utilisé dans notre projet (diglycolique, succinique et glutarique) sur le profil de libération *in vitro* du cabazitaxel sera explorée dans le cas des deux types de structure. Ces études de libération du cabazitaxel à partir des conjugués Y et linéaires ont été menées en partie chez Sanofi à Vitry-sur-Seine (études *in vitro* dans le plasma), parallèlement aux études entreprises au Laboratoire d'Hétérochimie Fondamentale et Appliquée (LHFA-Toulouse) dans les tampons (PBS et acétate).

Les études *in vivo*, décrites en partie dans le Chapitre I, menés sur des nanoparticules de PEG-PLA encapsulant un taxane permettent de mieux appréhender l'apport de ces systèmes. Leur efficacité est sans doute mieux jugée avec des études *in vivo*. Certes les études *in vitro* permettent de tirer les informations préliminaires, mais elles ne permettent pas toujours de prévoir exactement les interactions *in vivo*, lorsque plusieurs voies interfèrent dans la biodistribution du vecteur et du principe actif. Il est important de garder à l'esprit qu'*in vitro* il est difficile de mimer convenablement le milieu biologique qui est très complexe. Ce dernier met en jeu plusieurs paramètres difficiles à reproduire *in vitro* : une multitude de protéines plasmatiques et d'enzymes, un flux de transport sanguin complexe, des barrières biologiques, des tissus avec différentes caractéristiques, etc. La biodistribution des nanovecteurs et du principe actif dans l'organisme doit être donc étudiée à l'aide d'études pharmacocinétiques. Dans le cadre de notre projet, des études pharmacocinétiques, de biodistribution, de toxicité et d'efficacité ont été menées chez la souris à Sanofi avec les

nanoparticules de structure Y. Ces études permettent d'explorer la capacité de nos nanovecteurs à rester stables dans la circulation sanguine, à éviter la capture par le système phagocytaire mononucléaire (MPS), à atteindre efficacement la tumeur et à libérer le cabazitaxel préférentiellement à ce niveau.

## II. Formulation des nanoparticules

### 1. Etudes préliminaires

#### a. Solubilité

Comme nous l'avons mentionné dans le Chapitre I, les nanoparticules peuvent être préparées principalement selon deux techniques différentes : l'émulsification/évaporation de solvant et la nanoprécipitation. Nous avons tout d'abord vérifié la solubilité des différents conjugués dans quelques solvants organiques communs : des solvants miscibles à l'eau pour la technique de nanoprécipitation et des solvants non-miscibles à l'eau pour la technique d'émulsification/évaporation de solvant. La solubilité des conjugués a été déterminée visuellement de manière qualitative. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 9.

	Acétone ( $T_{\text{éb}} = 56^{\circ} \text{ C}$ )	EtOH ( $T_{\text{éb}} = 79^{\circ} \text{ C}$ )	THF ( $T_{\text{éb}} = 66^{\circ} \text{ C}$ )	Acétonitrile ( $T_{\text{éb}} = 82^{\circ} \text{ C}$ )	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ( $T_{\text{éb}} = 40^{\circ} \text{ C}$ )	AcOEt ( $T_{\text{éb}} = 77^{\circ} \text{ C}$ )
<b>Solubilité (mg/mL)</b>	> 100	< 0.66	> 140	> 100	> 120	> 120

**Tableau 9 : Solubilité du Conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-Succinyl-Cabazitaxel (M ~ 12 kDa). Les 4 premiers solvants sont miscibles à l'eau et les 2 derniers sont non-miscibles à l'eau.**

Le dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) et l'acétate d'éthyle (AcOEt), des solvants non-miscibles à l'eau, permettent d'atteindre des concentrations élevées en conjugué polymérique. Même si le dichlorométhane a été largement utilisé dans le passé pour la formulation de nanoparticules polymériques et que son évaporation est plus facile, l'acétate d'éthyle est actuellement plus utilisé parce qu'il possède un meilleur profil toxicologique.<sup>[7]</sup>

Concernant la méthode de nanoprécipitation, l'acétone semble être le bon candidat. Il est très miscible à l'eau et permet d'atteindre des concentrations élevées en conjugué polymérique. De plus, il a la température d'ébullition la plus basse ( $T_{\text{éb}} = 56^{\circ} \text{ C}$ ), ce qui permet de l'évaporer aisément après nanoformulation. Il permet également de préparer des nanoparticules de plus petites tailles en comparaison avec le THF, et avec un meilleur rendement. En effet, les paramètres importants, affectant les propriétés de la préparation des

nanoparticules, sont la miscibilité du solvant organique avec le non-solvant (phase aqueuse) et la nature des interactions polymère/solvant.<sup>[7;8]</sup> Les conditions optimales de la nanoprécipitation sont obtenues lorsque le polymère est dissout dans un solvant  $\theta$  et que la concentration du polymère dans le solvant organique est située entre un régime de solubilisation semi-dilué et un régime dilué.<sup>[8]</sup> Dans un solvant  $\theta$ , le système se trouve exactement à la frontière entre les régimes « bon » et « mauvais » solvant : les segments polymères n'éprouvent de préférence particulière ni pour les molécules du solvant ni pour d'autres segments de la chaîne, ils se comportent comme des « fantômes ».

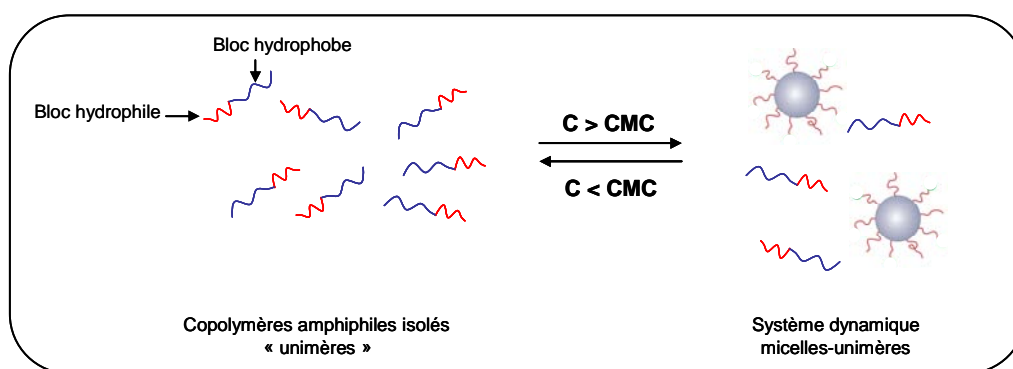
Comme décrit dans le Chapitre I, la nanoprécipitation est une méthode très simple, reproductible, économique et rapide. Tous ces avantages nous ont amenés à explorer en priorité cette technique. En général, la phase organique, solubilisant le polymère et le principe actif, est ajoutée à la phase aqueuse, mais il est également possible d'inverser le protocole en versant la phase aqueuse dans la phase organique. Le caractère amphiphile des copolymères PEG-PLA facilite la formation des nanoparticules sans l'utilisation de tensioactifs.

Avant de décrire la préparation des nanoparticules, nous avons d'abord essayé d'explorer l'influence du positionnement du PA dans les conjugués sur leur capacité à s'auto-assembler. Pour cela nous avons mené une étude de la concentration micellaire critique (CMC) des macromolécules.

#### *b. Concentration micellaire critique (CMC)*

La concentration à partir de laquelle un composé tensioactif s'auto-associe sous forme de micelles en solution aqueuse est appelée concentration micellaire critique (CMC). La valeur de la CMC est une caractéristique du tensioactif : elle dépend de la nature chimique du tensioactif (longueur de la chaîne lipophile, nature de la tête polaire) mais également de facteurs externes tels que la concentration en électrolytes ou la température.<sup>[9]</sup> Quelques règles générales peuvent être mentionnées. Pour une même classe de tensioactifs, la valeur de la CMC augmente avec le caractère hydrophile du tensioactif. A titre d'exemple, dans le cas de tensioactifs de Pluronic [PEO-PPO-PEO :  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_m-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{OH}$ ], la CMC croît avec le nombre de motifs d'oxyde d'éthylène (hydrophile), par rapport aux motifs d'oxyde de propylène (hydrophobe) et diminue lorsque le caractère hydrophobe augmente.<sup>[10]</sup>

Les copolymères à blocs amphiphiles présentant un segment lipophile et un segment hydrophile ont la faculté de s'auto-associer spontanément pour former des agrégats multimoléculaires organisés. L'agrégation spontanée intervient à partir de la concentration micellaire critique (CMC) (Figure 97). La CMC des micelles de polymères est généralement comprise entre  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$  mol/L. Ces CMC sont beaucoup plus faibles que celle des agents tensioactifs classiques pour lesquels les CMC sont comprises entre  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  mol/L.<sup>[11]</sup> Dans les agrégats, le cœur de la micelle est formé par l'association des parties lipophiles des copolymères à blocs (PLA), alors que la couronne de la micelle est constituée par les parties hydrophiles (PEG). Nous rappelons que ces micelles sont plutôt adaptées à l'encapsulation de principes actifs lipophiles piégés dans leur cœur.

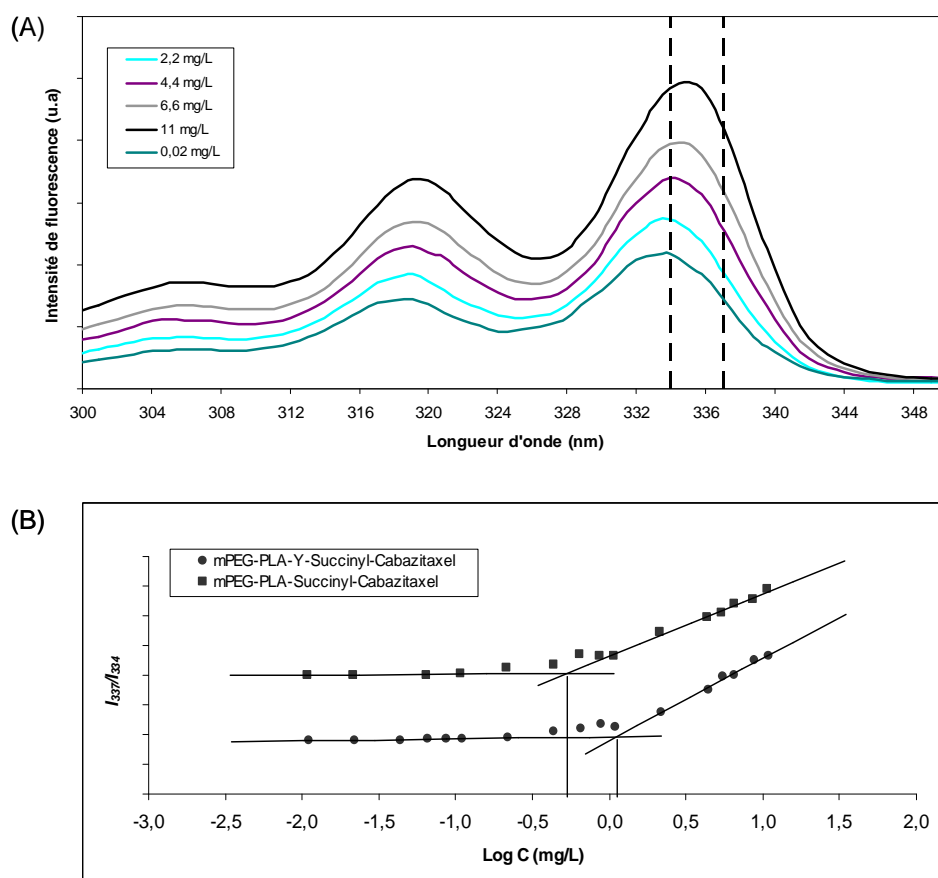


**Figure 97 : Représentation de copolymères amphiphiles isolés et auto-associés en milieux aqueux en fonction de la CMC.**

La valeur de la CMC peut être déterminée par différentes techniques : par mesure de tension de surface, par conductimétrie, par diffusion de la lumière, par spectrophotométrie UV-visible et par spectroscopie de fluorescence.<sup>[12;13]</sup> Wilhelm *et al.*<sup>[14]</sup> ont développé la technique de spectroscopie de fluorescence pour la détermination de la CMC d'un système de copolymères amphiphiles poly(styrène)-poly(éthylène glycol) (PS-PEG) en utilisant le pyrène comme sonde de fluorescence. En effet, cette technique est simple à mettre en œuvre et permet de déterminer de manière reproductible et efficace des valeurs de CMC très basses, contrairement à la majorité des autres techniques.<sup>[12]</sup> Cette technique repose sur la variation de la fluorescence du pyrène en fonction de son environnement. La bande vibrationnelle du pyrène est fortement sensible à la polarité de son environnement.<sup>[15]</sup>

Lorsque l'environnement du pyrène change de polarité, les spectres d'émission et d'excitation (ou absorption) sont modifiés. Sur le spectre d'excitation ( $\lambda_{\text{excitation}} = 300\text{-}350$  nm,  $\lambda_{\text{émission}} = 400$  nm) est enregistrée l'intensité d'excitation  $I_{\lambda}$  en fonction de la longueur d'onde  $\lambda_{\text{excitation}}$ .

Sur ce spectre, la bande vibrationnelle se décale progressivement de 334 nm ( $I_{\max} = I_{334}$ ) à 337 nm ( $I_{\max} = I_{337}$ ) lorsque la concentration en copolymère augmente (Figure 98 (A)). Ce décalage met en évidence le transfert du pyrène d'un environnement polaire vers un environnement apolaire permettant de fournir des informations sur la localisation du pyrène dans le système étudié. L'évolution de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration en copolymères (ou conjugués) peut donc être caractérisée par le rapport des intensités  $I_{337}/I_{334}$ . Un plateau qui correspond à un rapport  $I_{337}/I_{334}$  constant est caractéristique d'un environnement aqueux polaire, où les « unimères » sont isolés et le pyrène est totalement dissout dans l'eau (Figure 98 (B)). L'augmentation du rapport  $I_{337}/I_{334}$  avec la concentration montre bien le transfert progressif du pyrène vers le cœur hydrophobe (PLA) des micelles.



**Figure 98 : (A) Spectres d'excitation du pyrène dans une solution de conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-succinyl-Cabazitaxel. (B) Représentation du rapport  $I_{337}/I_{334}$  du spectre d'excitation du pyrène vs. Log C pour les conjugués linéaire et Y (12 kDa).**

Les valeurs de CMC ont été déterminées pour les différents copolymères amphiphiles et pour leurs conjugués correspondants afin d'explorer l'influence du cabazitaxel sur leur propriété d'auto-assemblage. Globalement, les valeurs de CMC des copolymères mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub> et

des conjugués correspondants sont dans la même gamme des valeurs publiées dans la littérature et qui sont généralement comprises entre 0.5 mg/L et 10 mg/L.<sup>[1;2;16-19]</sup> Comme montré dans le Tableau 10, les valeurs de CMC des conjugués (0.75 - 1 mg/L) sont environ 5 fois inférieures à celle des copolymères mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub> correspondants (4.60 – 4.70 mg/L). Cette différence est clairement attribuée à l'augmentation de l'hydrophobicité des conjugués apportée par l'incorporation du cabazitaxel, un principe actif très hydrophobe (coefficient de partage  $\text{Log}P_{\text{octanol/eau}} = \text{Log}(C_{\text{octanol}}/C_{\text{eau}}) = 3.9$ ). Cette dernière valeur permet d'appréhender le caractère hydrophobe d'une molécule : elle augmente avec son caractère lipophile ou hydrophobe et diminue avec son caractère hydrophile. Un phénomène d'auto-assemblage plus prononcé des copolymères est observé lorsque le cabazitaxel est couplé à la macromolécule. En effet, en présence de cabazitaxel les macromolécules amphiphiles ont tendance à former des micelles à des plus faibles concentrations, ce qui traduit également une meilleure stabilité des conjugués par rapport aux copolymères.

Entrée	Composés (M ~ 12 KDa)	$M_n$ (g/mol)	$M_w/M_n$	CMC (mg/L)
1	mPEG-PLA-OH	11700	1.15	4.70
2	mPEG-PLA-Y-OH	11800	1.18	4.60
3	mPEG-PLA-Diglycolyl-Cabazitaxel	11050	1.17	0.75
4	mPEG-PLA-Succinyl-Cabazitaxel	10970	1.15	0.75
5	mPEG-PLA-Y-Succinyl-Cabazitaxel	11770	1.15	1
6	mPEG-PLA-Y-Diglycolyl-Cabazitaxel	11920	1.24	1

**Tableau 10 : Concentration micellaire critique (CMC) des copolymères et des conjugués de structure linéaires et Y (M ~ 12 kDa).**

Ces résultats sont en accord avec les autres études menées sur des conjugués linéaires de mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>5000</sub>-paclitaxel ( $M_n \sim 11000$  g/mol) et de paclitaxel-PLA<sub>2100</sub>-PEG<sub>4600</sub>-PLA<sub>2100</sub>-paclitaxel ( $M_n \sim 10700$  g/mol). Dans le cas du premier conjugué di-blocs mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>5000</sub>, l'incorporation du paclitaxel en bout de chaîne de PLA a permis de réduire la CMC de 1.78 mg/L à 0.63 mg/L (un facteur de 2.8).<sup>[1]</sup> De la même manière, l'incorporation du paclitaxel en bout de chaîne de PLA du copolymère tri-blocs PLA<sub>2100</sub>-PEG<sub>4600</sub>-PLA<sub>2100</sub> a permis de diminuer la CMC en passant d'environ 8 mg/L à environ 2.5 mg/L (un facteur de 3.2).<sup>[2]</sup>

Nous observons aussi une légère diminution de la valeur de CMC, en passant du conjugué de structure Y (lignes 5 et 6) au conjugué linéaire (lignes 3 et 4) (1 vs 0.75 mg/L). Cette différence de CMC entre les conjugués linéaires et de structure Y traduit, comme expliqué précédemment, une meilleure stabilité des nanoparticules à base de conjugués linéaires. Ce résultat pourrait être expliqué par la localisation du cabazitaxel à l'interface

hydrophile/hydrophobe dans le cas de la structure Y. Cette position du cabazitaxel, une molécule très hydrophobe et de masse molaire élevée, pourrait en effet d'une part gêner les interactions inter-chaînes de PLA et d'autre part perturber le caractère amphiphile du copolymère. Ces deux phénomènes pourraient déstabiliser l'auto-assemblage des copolymères et donc la formation de nanoparticules avec un cœur hydrophobe « solide » et compact, en comparaison avec les conjugués linéaires.

Par ailleurs, il semble que les deux espaceurs étudiés (diglycolique et succinique) n'ont aucun effet sur la CMC. Ce qui veut dire que ces espaceurs ne changent pas la balance hydrophile/hydrophobe des conjugués étudiés.

Une première différence de CMC est observée entre les conjugués de structure Y et les conjugués linéaires. Cette différence semble être due à la position du cabazitaxel au sein du conjugué. Il faut maintenant vérifier si cette différence se répercute sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules.

## ***2. Nanoprécipitation des conjugués***

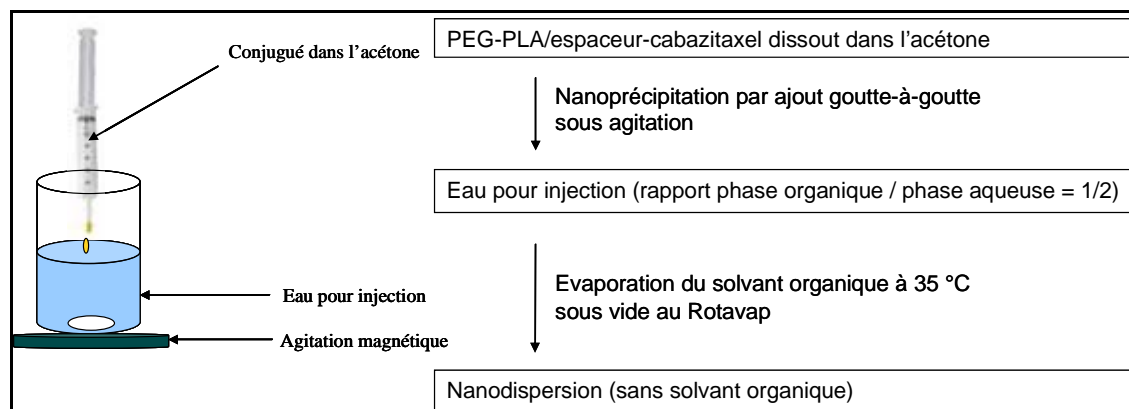
Les nanoparticules ont été préparées par la méthode de nanoprécipitation comme décrit dans la Figure 99. Les conjugués linéaires et Y sont dissout dans l'acétone. La solution est ensuite ajoutée goutte-à-goutte à la phase aqueuse, sous agitation modérée. Nous rappelons que l'insolubilité du PLA dans l'eau lui permet de précipiter pour former un cœur hydrophobe. Le PEG, hydrophile, quant à lui permet de stabiliser les nanoparticules en formant une couronne sous forme de « brosse » à leur surface. Le caractère hydrophobe du cabazitaxel lui permettra de s'incorporer dans le cœur hydrophobe des nanoparticules, formé par le PLA.

Différentes concentrations finales supérieures à 5 mg/mL ont été visées. Le but étant d'obtenir des nanodispersions stables avec une charge en PA assez élevée qui permettrait d'atteindre facilement la dose thérapeutique optimale après administration du médicament dans l'organisme.

Le rapport volumique « phase organique/phase aqueuse » utilisé lors de la nanoprécipitation est de 1/2. La phase aqueuse correspond soit à de l'eau pour injection (WFI, de l'anglais « *water for injection* »), soit à une solution aqueuse 5% dextrose, soit à une solution 0.9% NaCl. Le but d'utiliser ces deux dernières solutions est d'avoir des formulations avec une osmolarité de l'ordre de 300 mOsm (qui correspond à l'osmolarité plasmatique normale chez



l'animal) pour éviter le phénomène d'éclatement des globules après injection intraveineuse. L'osmolarité correspond à la concentration des solutés qui vont exercer un pouvoir attractif sur les molécules d'eau. Lorsque l'osmolarité est plus élevée (hyperosmolarité) dans un compartiment par rapport à un autre, les molécules d'eau du deuxième compartiment passent dans le premier afin de tendre vers un équilibre d'osmolarité.



**Figure 99 : Technique de préparation des nanoparticules : Nanoprécipitation.**

Le conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-succinyl-Cabazitaxel a été formulé également par nanopréciipitation en présence de tensioactifs dans la phase aqueuse : le Solutol HS15 (Macrogol 15 Hydroxystéarate) et le déoxycholate de sodium. La présence de tensioactifs permet d'améliorer la stabilité des nanoparticules et d'atteindre des concentrations en conjugué élevées (jusqu'à 140 mg/mL). Cette formulation a été réalisée chez Sanofi à Vitry-sur-Seine dans l'objectif d'étudier la pharmacocinétique des nanoparticules et du PA *in vivo*.

En plus du critère de la dose thérapeutique optimale mentionné précédemment, un faible volume d'injection et une quantité élevée de PA sont nécessaires pour mener des études pharmacocinétiques chez la souris. A titre indicatif, le volume d'injection maximum chez la souris est d'environ 10 mL/Kg (~ 0.2 mL pour une souris de 20 g). Ce volume doit contenir environ 40 mg/Kg de PA (~ 570 mg/Kg de conjugué, si le taux de charge en PA est de 7%), ce qui correspond à une concentration minimale en conjugué d'environ 57 mg/mL.

Avec cette méthode de nanopréciipitation, la concentration finale des nanodispersions est comprise entre 10 et 140 mg/mL.

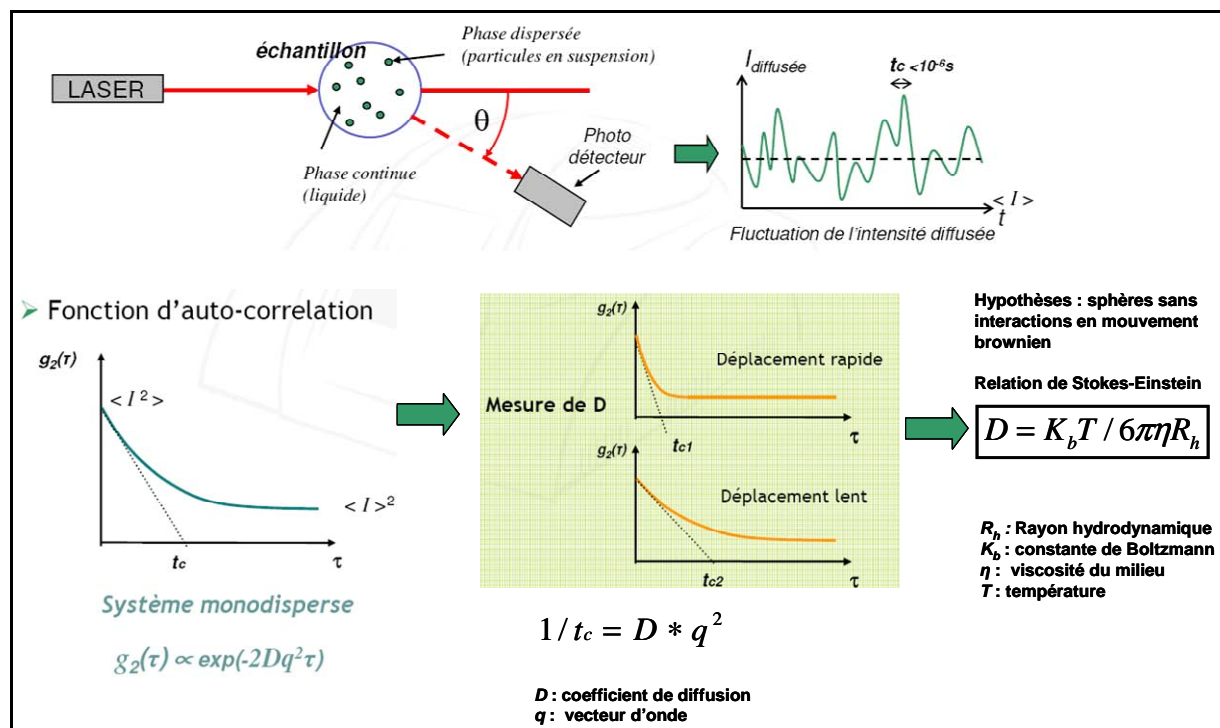
Toutes ces nanodispersions préparées sont ensuite conservées à 4 °C et à température ambiante pour étudier leur stabilité au cours du temps.

### ***3. Détermination de la taille des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière (DLS)***

La mesure de la taille des différentes nanoparticules préparées précédemment a été réalisée à l'aide de la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS).

La DLS, aussi appelée spectroscopie par corrélation de photons (PCS) ou diffusion quasi-élastique de la lumière (QELS), est une technique non destructive développée pour mesurer la taille des particules dans le domaine submicronique. Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules qui est le mouvement aléatoire des particules causé par l'agitation thermique.<sup>[20]</sup>

Lorsque la lumière d'un laser atteint des petites particules dans une microcuvette, la lumière diffuse dans toutes les directions. L'intensité de la lumière diffusée par les particules est ensuite mesurée à un angle donné au cours du temps par un photomultiplicateur. Le mouvement brownien des particules modifie constamment les distances entre les particules diffusantes dans le temps. Le déplacement des particules engendre alors des fluctuations au niveau des interactions constructives et destructives de la lumière diffusée. Le traitement de ces fluctuations par un corrélateur numérique permet d'obtenir une fonction d'auto-corrélation ( $g_2(\tau)$ ) du signal qui représente la probabilité pour une particule de se trouver à un instant  $t+dt$  au même point de l'espace qu'à l'instant  $t$ . Plus une particule est petite, plus son mouvement brownien est rapide et plus cette probabilité est faible. Le traitement mathématique de la fonction d'auto-corrélation permet donc d'obtenir le temps de relaxation ( $t_c$ ) qui est reliée au coefficient de diffusion des particules, lui-même relié au rayon hydrodynamique via la relation de Stokes-Einstein (Figure 100). Le rayon hydrodynamique mesuré est en effet le rayon d'une sphère théorique qui aurait le même coefficient de diffusion que la particule considérée. Dans le cas d'une pelote polymère, ce rayon correspond au rayon d'une sphère dans laquelle le solvant ne pénètre pas. Pour une particule chargée, la sphère considérée contient la particule entourée de sa couche diffuse, ce qui entraîne une surestimation par rapport à une mesure de taille par microscopie.



**Figure 100 : Principe de la mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules par diffusion dynamique de la lumière.**

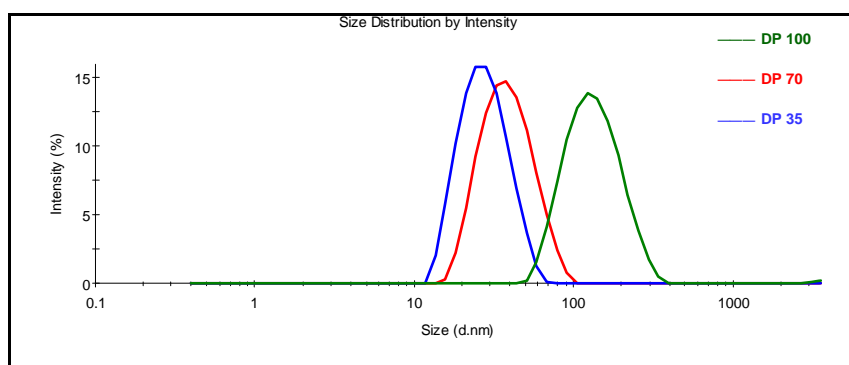
En analysant les dispersions obtenues sans tensioactifs par la technique DLS et à l'œil nu, il s'est avéré qu'à partir de 15 mg/mL, les nanoparticules s'agrègent et précipitent. Cette agrégation est plus importante pour une taille de PLA de l'ordre de 14.4 kDa (DP 100). Lorsque la taille de la chaîne hydrophobe augmente, ceci amène à la perte progressive du caractère amphiphile du copolymère. Il en résulte donc une agrégation des objets formés.

Nous avons donc choisi de préparer les nanoparticules à une concentration optimale de l'ordre de 10 mg/mL, afin d'éviter ce phénomène d'agrégation. La distribution de taille des nanoparticules mesurée par DLS montre une étroite distribution monomodale pour les différents conjugués. Le diamètre hydrodynamique des différentes nanoparticules à base de mPEG-PLA/Cabazitaxel est compris entre 27 nm et 125 nm (Tableau 11).

Structures	Entrée	DP (PLA)	$M_{n(PEG)}/M_{n(PLA)}$ (g/mol)	Diamètre hydrodynamique (nm) moyenne $\pm$ SD	Indice de polydispersité (PDI) moyenne $\pm$ SD
Y	1	100	2000/14400	125.0 $\pm$ 5.5	0.20 $\pm$ 0.05
	2	70	2000/10000	37.5 $\pm$ 3.7	0.16 $\pm$ 0.03
	3	35	2000/5000	25.2 $\pm$ 2.4	0.15 $\pm$ 0.05
Linéaires	4	100	2000/14400	80.1 $\pm$ 1.6	0.30 $\pm$ 0.04
	5	70	2000/10000	27.1 $\pm$ 1.3	0.17 $\pm$ 0.06

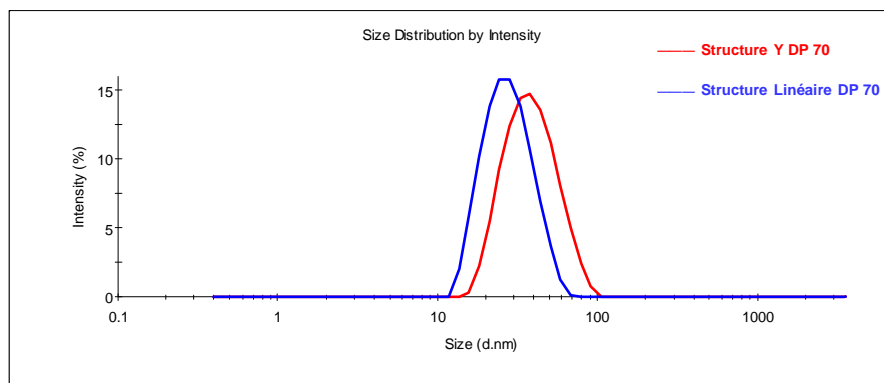
**Tableau 11 : Diamètre hydrodynamique et indice de polydispersité des nanoparticules de conjugués de structures linéaires et Y (10 mg/ml) déterminés par DLS.**

Il est à noter que ce diamètre augmente avec la masse moléculaire de la partie hydrophobe (PLA) (Figure 101). Ce résultat s'explique par le rôle structurel joué par le PLA parce qu'il définit le cœur hydrophobe du vecteur. Plus ce polymère est long, plus le cœur sera gros. Ces observations vont dans le même sens que les études menées par Riley *et al.* en utilisant la technique de diffusion des neutrons aux petits angles (*Small-Angle Neutron Scattering* SANS).<sup>[21]</sup> En effet, les auteurs ont exploré la structure interne des nanoparticules formées à partir de copolymères de mPEG-PLA. Trois copolymères, avec une taille fixe de mPEG (5 kDa) et trois masses molaires différentes de PLA deutéré (3, 15 et 45 kDa) ont été utilisés. Il a été démontré que le rayon hydrodynamique des nanoparticules augmente avec la masse moléculaire du bloc de PLA.



**Figure 101 : Distribution de taille en DLS des nanoparticules à base de conjugués Y en fonction de la taille du bloc PLA.**

Nous remarquons également que le diamètre des nanoparticules à base de conjugués linéaires est légèrement inférieur à celui des nanoparticules à base de conjugués de structure Y. A titre d'exemple, pour un PLA de DP 70, les diamètres moyens des nanoparticules linéaires et Y sont respectivement 27.1 nm et 37.5 nm (Figure 102). Cette différence de taille pourrait être due à l'amélioration du caractère hydrophobe induit par la présence du cabazitaxel dans le centre des nanoparticules dans le cas des conjugués linéaires. En revanche, dans le cas du conjugué Y, le cabazitaxel serait positionné à l'interface hydrophile/hydrophobe. Cette position pourrait en effet influencer le caractère compact du cœur hydrophobe, pour obtenir des diamètres plus élevés. Ce résultat confirme en quelque sorte l'hypothèse avancée par les résultats de CMC décrits précédemment, où les conjugués Y s'auto-assemblent moins facilement et sont donc moins stables que les conjugués linéaires (CMC respectives : 1 mg/L vs 0.75 mg/L).



**Figure 102 : Comparaison de la distribution de taille pour une même taille de conjugué (~ 12 kDa) : structure Y vs structure linéaire.**

Lorsque les nanoparticules à base de conjugué Y (12 kDa) sont préparées en présence de tensioactifs (Solutol HS1/Deoxycholate de sodium), leur diamètre hydrodynamique reste inférieure à 100 nm (taille moyenne d'environ 30 nm, pour toutes les concentrations) (Tableau 12). Les particules plus larges peuvent être retirées par filtration 0.45  $\mu\text{m}$ . L'utilisation de tensioactifs permet clairement d'obtenir des nanoparticules de petite taille et stables tout en atteignant des concentrations jusqu'à 14 fois supérieure à la concentration atteinte sans tensioactifs.

Entrée	Concentration finale (mg/mL)	Diamètre hydrodynamique moyen (nm)	Indice de polydispersité (PDI)
1	20.7	28.5	0.14
2	33.3	29.4	0.13
3	53.8	32.0	0.08
4	86.7	29.5	0.15
5	140.0	32.5	0.10

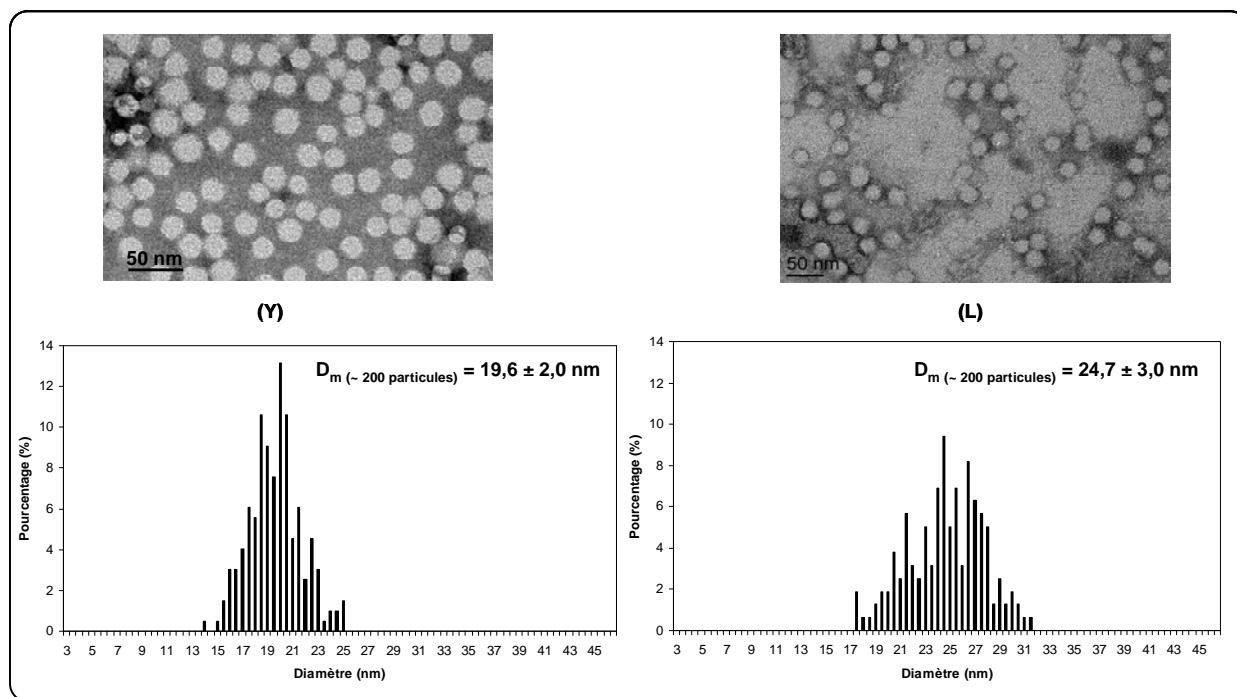
**Tableau 12 : Diamètre hydrodynamique et indice de polydispersité (déterminés par DLS) des nanoparticules du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-Y-succinyl-cabazitaxel préparées en présence de tensioactifs.**

Comme nous l'avons expliqué plus haut, la technique de DLS permet d'estimer le diamètre hydrodynamique des objets en faisant l'hypothèse que les objets étudiés ont une morphologie sphérique, ce qui n'est pas toujours vrai. Pour confirmer cette hypothèse il faut donc vérifier la morphologie des nanoparticules par une technique directe. La microscopie électronique à transmission (MET ou TEM) est l'outil idéal pour l'observation de ces objets nanométriques.

#### ***4. Caractérisation des nanoparticules par microscopie électronique à transmission (MET)***

La morphologie des nanoparticules préparées a été explorée par microscopie électronique en transmission (MET). Les échantillons sont préparés par coloration négative à l'aide d'une solution aqueuse d'acide phosphotungstique 0.2% (w/v). Ce dernier permet d'améliorer le contraste et d'observer ainsi les nanoparticules qui apparaissent blanches sur un fond noir. L'échantillon est déposé sur une grille de cuivre recouverte d'une membrane de carbone et laissé sécher à l'air à température ambiante.

Les analyses MET ont été menées pour les nanoparticules à base de conjugués linéaires et de structure Y. Les images MET (Figure 103) confirment la morphologie sphérique et uniforme des nanoparticules avec une distribution de taille relativement étroite, quelque soit la structure du conjugué (linéaire ou Y). La taille des nanoparticules a été déterminée à partir de différents clichés MET après comptage d'environ 200 nanoparticules (Figure 103). Le diamètre moyen des nanoparticules en MET est légèrement inférieur à celui déterminé par DLS : environ 20 nm pour les deux structures avec un bloc de PLA de masse moléculaire de l'ordre de 10 kDa (DP 70). Cette différence peut être liée à la déshydratation et au rétrécissement des nanoparticules durant le séchage pour les mesures de MET.



**Figure 103 : Clichés MET en coloration négative et distributions de taille déterminés à partir des clichés MET des nanoparticules à base de conjugués mPEG-PLA/Succinyl-Cabazitaxel (M ~ 12 kDa) linéaires (L) et de structure Y (Y).**

Toutes ces études menées sur les conjugués linéaires et de structure Y montrent bien que la position du cabazitaxel, que ce soit en bout de chaîne de PLA ou à l'interface PEG/PLA, n'influence pas la formation de nanoparticules, avec une morphologie sphérique uniforme et une étroite distribution de taille observée dans les deux cas.

L'autre caractéristique importante des nanoparticules est leur charge de surface. Ce paramètre influence considérablement la stabilité des nanoparticules dans le milieu de dispersion et leur capacité à éviter le phénomène d'opsonisation (cf. Chapitre I). Cette charge de surface est classiquement caractérisée par le potentiel zêta qui sera présenté dans le paragraphe suivant.

### 5. Potentiel Zêta

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule colloïdale acquiert en solution grâce aux ions qui l'entourent. La solvation d'une particule chargée affecte la distribution des ions dans la région interfaciale entourant la particule. Il en résulte une augmentation de la concentration des contre-ions près de la surface. Par conséquent, il se forme une double couche ionique. La couche interne (couche de Stern) est composée d'ions de charge opposée à celle de la surface de la particule. Ces ions sont fortement liés à la particule. La couche de Stern attire à son tour des ions de charge opposée, i.e. de même

charge que la particule. Cette dernière est appelée couche de Gouy ou couche diffuse. Elle contient également une faible proportion de charges identiques à celles de la couche de Stern. Au sein de cette couche diffuse, il y a une limite intérieure (plan glissant) où les ions et la particule forme une entité stable. Lorsque la particule est mise en mouvement, par mouvement brownien ou induit par un champ électrique, les ions à l'intérieur de ce plan glissant restent liés à la particule et suivent son mouvement, alors que les ions extérieurs restent avec le dispersant. Le potentiel au niveau de ce plan glissant est le potentiel zêta (Figure 104).

La valeur absolue du potentiel zêta donne une indication importante sur la stabilité du système colloïdal. Si toutes les particules ont un potentiel zêta négatif ou positif élevé, elles auront tendance à se repousser et à éviter l'agrégation. Cependant, les particules ayant un faible potentiel zêta vont avoir tendance à se rapprocher et à s'agréger. En général, la limite entre suspensions stables et suspension instables se situe soit vers +30 mV soit vers -30 mV. Les particules ayant un potentiel zêta plus positif que +30 mV ou plus négatif que -30 mV sont donc considérées comme stables. Ces valeurs limites ne prennent pas en compte le phénomène de répulsion stérique rencontré dans le cas de nanoparticules « PEGylées ». Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre I, le recouvrement des nanoparticules par une couche de PEG neutre permet de faire tendre leur charge de surface vers la neutralité tout en assurant leur stabilité grâce aux répulsions stériques entre les chaînes de PEG et aux répulsions électrostatiques (si la charge de surface n'est pas nulle).



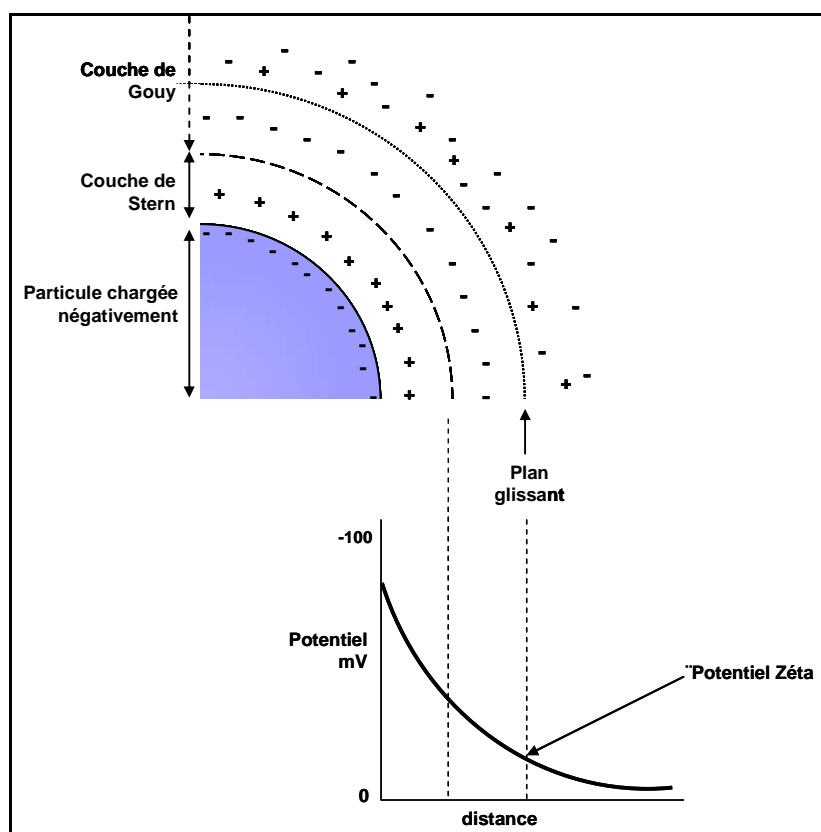


Figure 104 : Représentation schématique du potentiel zêta.

Comme mentionné dans le Chapitre I, dans le domaine de délivrance de principe actif, il est préférable d'avoir des nanoparticules ayant un potentiel zêta négatif ou neutre afin d'éviter l'adsorption des protéines plasmatiques à la surface des particules et faciliter ainsi leur reconnaissance et élimination par le MPS.

Le potentiel zêta des nanoparticules a été mesuré à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern). Les dispersions colloïdales sont diluées dans une solution aqueuse de NaCl  $10^{-3}$  M.

Les potentiels zêta de différentes dispersions sont récapitulés dans le Tableau 13. Pour une même taille de copolymères et de conjugués (12 kDa), le potentiel zêta ne varie pas significativement ( $\sim -25$  mV). Nous remarquons que la structure du conjugué (linéaire ou Y), la présence du cabazitaxel et la nature de l'espaceur n'ont pas d'effet sur la valeur du potentiel zêta. Ce dernier semble être gouverné essentiellement par les chaînes de PEG et de PLA. Une telle valeur négative est généralement expliquée dans la littérature par la présence de groupements carboxyliques ionisés à la surface des nanosphères.<sup>[22;23]</sup> Dans le cas de nanoparticules à base de PLA uniquement (1<sup>ère</sup> génération), ces groupements sont en extrémité de chaîne de PLA (HO-PLA-COOH), ce qui induit une charge de surface très négative ( $\sim -50$  mV).<sup>[23;24]</sup> L'utilisation de copolymères de PEG-PLA permet de réduire cette

valeur négative (jusqu'à environ -6 mV) puisque les fonctions carboxyliques du PLA sont recouvertes par les chaînes de PEG.<sup>[23;24]</sup> Dans certains cas, une charge plus négative (comprise entre -15 mV et -30 mV) à la surface de nanoparticules de PEG-PLA est attribuée par les auteurs à la présence d'homopolymères de PLA résiduels, comportant donc des groupements carboxyliques.<sup>[23]</sup>

Dans notre cas, la caractérisation poussée des différents copolymères et conjugués (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DOSY, SEC) nous a permis de confirmer l'absence d'homopolymères de PLA et donc de groupements carboxyliques ionisés. La valeur négative du potentiel zêta pourrait être donc attribuée aux charges partielles négatives générées par la polarité des fonctions esters du PLA.

Entrée	Copolymères composant les NPs	$M_{n(\text{PLA})}$ (g/mol)	$M_{n(\text{PEG})}$ (g/mol)	PEG (wt%)	$D_h$ moyen (nm) ( $\pm$ SD)	Potentiel Zêta (mV) ( $\pm$ SD)
1	mPEG-PLA-Y-OH	10000	2000	17	28.1 ( $\pm$ 0.5)	-28.3 ( $\pm$ 8)
2	mPEG-PLA-Y-Succinyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	38.8 ( $\pm$ 0.9)	-20.4 ( $\pm$ 11)
3	mPEG-PLA-Y-Glutaryl-Cabazitaxel	10000	2000	17	45.0 ( $\pm$ 2.3)	-22.2 ( $\pm$ 10)
4	mPEG-PLA-Y-Diglycolyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	40.2 ( $\pm$ 0.7)	-24.5 ( $\pm$ 10)
5	mPEG-PLA-OH	10000	2000	17	26.3 ( $\pm$ 1.0)	-24.2 ( $\pm$ 10)
6	mPEG-PLA-Succinyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	27.4 ( $\pm$ 1.3)	-27.4 ( $\pm$ 8)
7	mPEG-PLA-Diglycolyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	33.7 ( $\pm$ 2.3)	-26.3 ( $\pm$ 8)

**Tableau 13 : Diamètres hydrodynamiques ( $D_h$ ) et Potentiels zêta de différentes dispersions (n>3).**

D'un autre côté, lorsque la proportion du bloc de PEG augmente (de 17% à 33% w/w) en faisant varier la taille de la chaîne de PLA ou de la chaîne de PEG, le potentiel zêta diminue de manière significative (de -24 mV à -10 mV) (Tableau 14). Cette observation montre que lorsque la densité de surface du PEG augmente, son rôle de masquage devient de plus en plus important et donc le potentiel zêta des particules tend vers la neutralité (le PEG possède une charge neutre). Ce résultat est cohérent avec les études menées par Gref *et al.*<sup>[24]</sup> avec des nanoparticules à base de mPEG-PLA. Les auteurs ont réussi à démontrer qu'en augmentant la densité de surface du PEG, le rôle de protection stérique de ce dernier augmente. Il en résulte en effet une diminution de la charge négative du potentiel zêta. En effet, le potentiel zêta augmente graduellement d'environ -48 mV à -10 mV en augmentant la proportion massique du PEG de 0.5% à 20%.

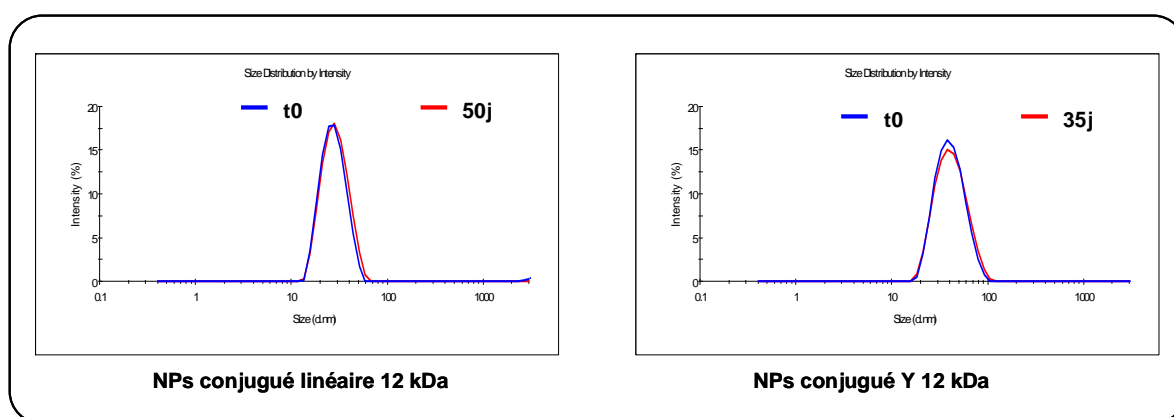
Entrée	Copolymères composant les NPs	M <sub>n</sub> (PLA) (g/mol)	M <sub>n</sub> (PEG) (g/mol)	PEG (wt%)	D <sub>n</sub> moyen (nm) (±SD)	Potentiel Zéta (mV) (±SD)
1	mPEG-PLA-Y-Succinyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	38.8 (±0.9)	-20.4 (±11)
2	mPEG-PLA-Y-Glutaryl-Cabazitaxel	10000	2000	17	45.0 (±2.3)	-22.2 (±10)
3	mPEG-PLA-Y-Diglycolyl-Cabazitaxel	10000	2000	17	40.2 (±0.7)	-24.5 (±10)
4	mPEG-PLA-Y-Diglycolyl-Cabazitaxel	5000	2000	28	32.4 (±3.1)	-14.5 (±5.5)
5	mPEG-PLA-Y-Diglycolyl-Cabazitaxel	10000	5000	33	47.6 (±4.9)	-10.3 (±4.2)

**Tableau 14 : Variation du potentiel zéta avec la proportion de PEG au sein des conjugués (n>3).**

Le potentiel zéta négatif observé pour les différentes nanodispersions confère donc aux nanoparticules un caractère stable grâce aux répulsions électrostatiques. A ces répulsions s'ajoutent également les répulsions stériques assurées par la couronne de PEG. Ces deux types de répulsions permettent ainsi de contrebalancer les forces d'attractions inter-particulaires de Van der Waals, ce qui permet d'éviter leur agrégation. De plus, comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre I, une charge de surface négative ou neutre est souhaitée pour éviter l'opsonisation et l'élimination rapide par le système phagocytaire mononucléaire (MPS). Toutes ces données placent donc nos systèmes comme de bons candidats pour leur évaluation *in vitro* et *in vivo*.

## 6. Stabilité des Nanoparticules

Les nanoparticules ont été conservées à température ambiante et à 4 °C. L'observation visuelle des dispersions montre qu'il n'y a pas eu d'agrégation après 2 semaines de conservation. Cette observation visuelle est confirmée par la mesure de la distribution de taille par DLS. Lorsque les nanoparticules sont conservées à 4 °C, leur stabilité physique est au moins de 35 jours (Figure 105).



**Figure 105 : Distribution de taille des nanoparticules issues de la formulation du conjugué linéaire et du conjugué de structure Y (mPEG-PLA/Succinyl-Cabazitaxel 12 kDa), après fabrication et après 50 et 35 jours de conservation à 4 °C.**

Les formulations préparées à 10 mg/ml sont ainsi très stables dans le temps, tant au niveau de la taille que du potentiel zêta.

La stabilité chimique des conjugués a été également vérifiée après formulation et conservation de deux semaines à 4 °C. Après séchage des dispersions par évaporation de l'eau, les produits ont été analysés par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  et par SEC. Les résultats d'analyse ne montrent aucune modification chimique des conjugués en RMN et aucune variation de la distribution de la masse moléculaire en SEC. Il est à noter donc que la procédure de préparation des nanoparticules utilisée n'affecte pas la structure chimique des conjugués.

En conclusion, les conjugués de structures Y et linéaires ont permis, par une méthode simple à mettre en œuvre, la préparation de nanoparticules sphériques avec des tailles inférieures à 100 nm. De plus, ces nanoparticules montrent une stabilité satisfaisante puisqu'elle excède 1 mois à 4 °C. Ces nouvelles architectures avec un PA entre les blocs de PEG et de PLA ne perturbent ni la formation des nanoparticules, ni leur stabilité. Des premières singularités ont été observées sur les conjugués Y par rapport aux conjugués linéaires, particulièrement en termes de CMC et de taille, probablement dues au positionnement du PA au sein des nanoparticules. Pour approfondir ces études, nous allons essayer dans un premier temps d'analyser la distribution du PA plus en détails, et dans un second temps d'explorer les cinétiques de libération du cabazitaxel à partir des deux familles de nanoparticules.

### **III. Localisation et Libération in vitro du cabazitaxel**

#### ***1. Localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules***

Une fois les nanoparticules préparées, il est important de vérifier leur conformation « cœur-couronne », de localiser le cabazitaxel au sein de ces nanovecteurs et d'étudier son profil de libération dans le cas de deux structures (linéaire et Y). En ce qui concerne la localisation du cabazitaxel, nous avons essayé d'explorer deux techniques différentes : (i) la microscopie et (ii) la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .

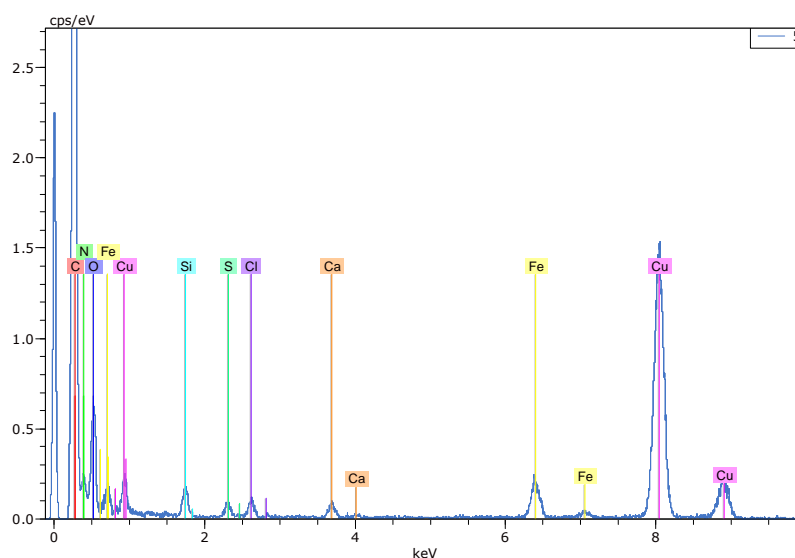
##### ***a. Analyse microscopique***

Comme cela a été décrit précédemment, la microscopie TEM a été utilisée pour visualiser les nanoparticules préparées à partir des différents conjugués Y et linéaires. Cette technique a

permis de vérifier la morphologie sphérique des nanoparticules et d'estimer leur taille à l'état sec.

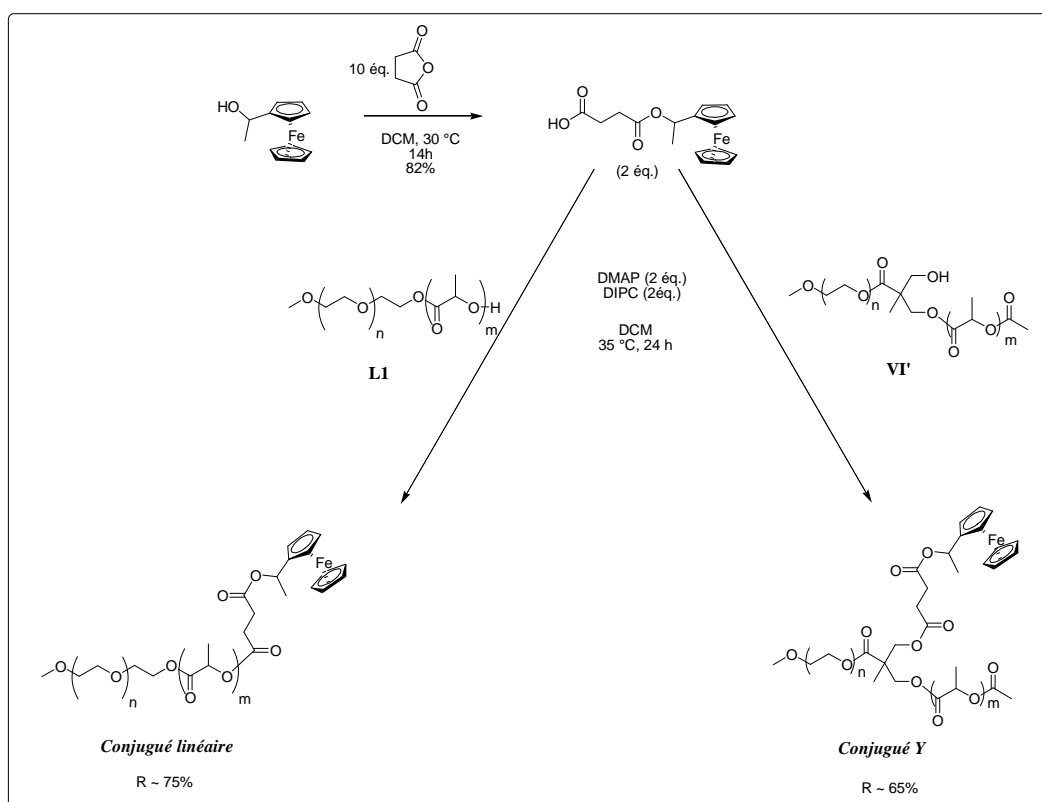
Par ailleurs, nous avons essayé d'utiliser la microscopie électronique afin de localiser le principe actif au sein des nanoparticules. Parmi les méthodologies possibles, la combinaison de la microscopie électronique en transmission à balayage (STEM de l'anglais « *Scanning Transmission Electron Microscopy* ») et de l'EDX (de l'anglais « *Energy Dispersive X-ray* ») permet de dresser une cartographie chimique de l'échantillon, en analysant les rayons X émis par les atomes sous l'effet des électrons. En effet, un faisceau électronique traversant l'échantillon provoque l'ionisation d'atomes, et ce dernier émet des rayons X lors de sa désexcitation. L'énergie du rayonnement émis est caractéristique de la nature chimique de l'échantillon et permet donc de faire une analyse élémentaire, c'est-à-dire de savoir quels sont les atomes présents dans l'échantillon.

La principale limitation de ce système d'analyse chimique provient de la résolution du système qui est de l'ordre de quelques dizaines d'eV. Les pics du carbone, de l'azote et de l'oxygène (énergie respective des raies  $K\alpha_1$  : 0.30 keV, 0.40 keV et 0.53 keV) ne sont pas totalement séparés (Figure 106). Il est donc très difficile de visualiser le cabazitaxel qui se différencie (au niveau éléments chimiques) de la chaîne de copolymère uniquement par la présence d'un seul atome d'azote dans sa molécule. Afin de vérifier la différence de distribution spatiale au sein des nanoparticules en fonction de la structure (Y ou linéaire), nous avons couplé aux copolymères linéaire et Y une molécule modèle de « Ferrocène-succinique-COOH », permettant ainsi une détection plus efficace grâce à l'atome lourd de Fer (Fe,  $K\alpha_1 \sim 65$  keV) (Figure 106).



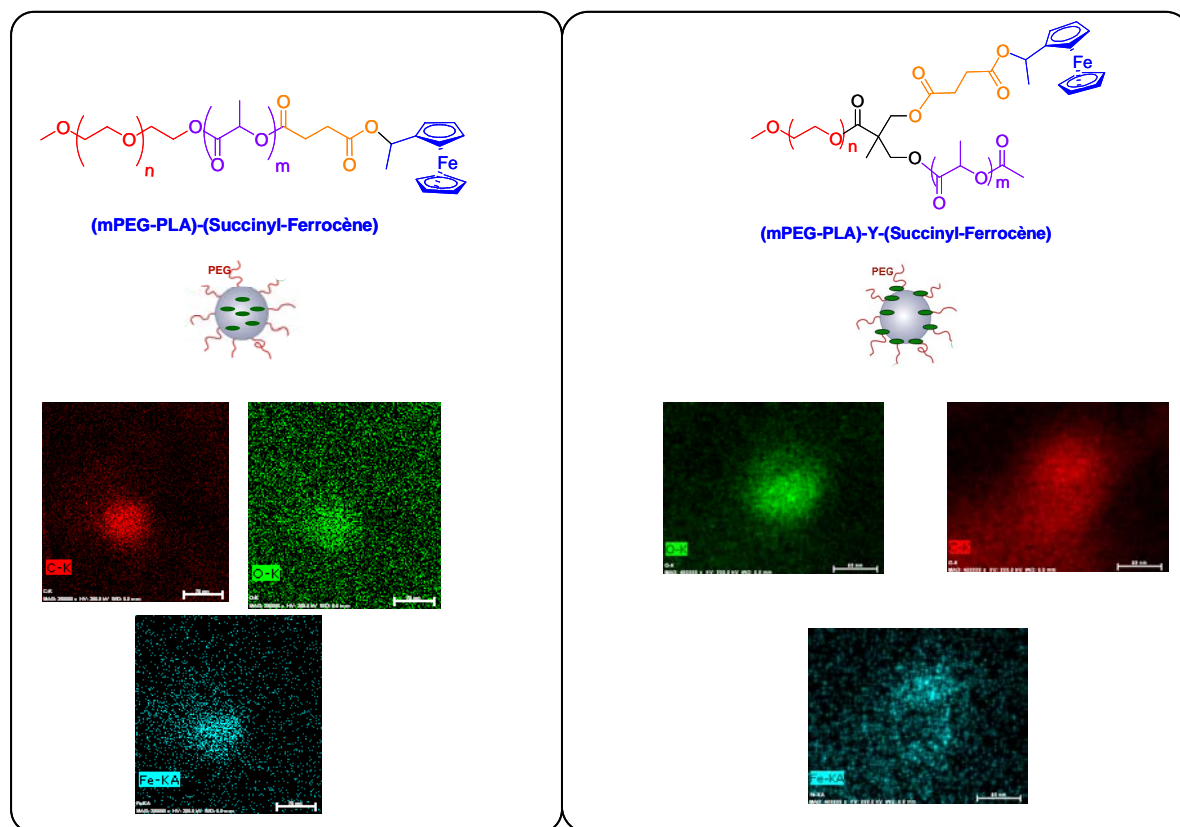
**Figure 106 : Spectre EDX d'un échantillon de nanoparticules de mPEG-PLA-succinyl-ferrocène visualisé en STEM.**

Les conjugués linéaire et Y sont synthétisés selon la même stratégie utilisée pour la synthèse des conjugués de cabazitaxel, en remplaçant ce dernier par l' $\alpha$ -hydroxyéthylferrocène (racémique) (Figure 107).



**Figure 107 : Schéma de synthèse des conjugués mPEG-PLA/succinyl-ferrocène linéaire et Y (12 kDa).**

Après la synthèse des conjugués linéaire et Y (12 kDa), les nanoparticules ont été préparées par nanopréciipitation à une concentration finale de 5 mg/mL (Diamètres moyens respectifs par DLS : 50 nm, PDI ~ 0.20 et 42 nm, PDI ~ 0.22). Les échantillons à visualiser en STEM-EDX ont été préparés en diluant la dispersion (environ 10 fois) et en absence d'agent de contraste. Les premiers résultats de l'analyse STEM-EDX donnent un premier indice sur la distribution du ferrocène au sein des nanoparticules à base de conjugués linéaire et Y (Figure 108). Sur les images des nanoparticules à base de mPEG-PLA-succinyl-ferrocène linéaire, les signaux du Fer (pixels bleus) semblent être superposés aux signaux du carbone (pixels rouges) et de l'oxygène (pixels verts) relatifs au copolymère qui constitue les nanoparticules. Le ferrocène serait ainsi reparti de manière homogène dans le centre des nanoparticules. En revanche, avec le conjugué Y, les signaux du Fer semblent être localisés à la périphérie de la nanoparticule. Le ferrocène serait donc proche de la surface des nanoparticules.



**Figure 108 :** Clichés STEM-EDX des nanoparticules à base de conjugués mPEG-PLA/Ferrocène (linéaire et Y, 12 kDa).

Malheureusement, la résolution obtenue avec cette technique n'est pas assez fine pour permettre de conclure de façon claire sur la position de la molécule modèle au sein des deux familles de nanoparticules. Actuellement, des tests sont en cours pour améliorer cette résolution en jouant sur les paramètres expérimentaux de la microscopie. Des expériences

sont également en cours à l'aide de la spectroscopie de perte d'énergie (EELS, de l'anglais « *Electron Energy Loss Spectroscopy* »). Cette technique est basée sur les pertes d'énergie qui résultent des interactions inélastiques entre un faisceau d'électron et l'échantillon. L'EELS, qui est beaucoup plus difficile à mettre en œuvre, montre une meilleure résolution en comparaison avec l'EDX ( $\sim 1$  eV vs quelques dizaines d'eV).

*b. RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules dans le  $\text{D}_2\text{O}$*

Parmi les méthodes utilisées dans la littérature pour explorer la conformation « cœur-couronne » des nanoparticules de PEG-PLA, la spectroscopie RMN des nanoparticules dans le  $\text{D}_2\text{O}$  apparaît comme un bon outil.<sup>[21;25;26]</sup> Ces études sont possibles parce que le système nanoparticulaire adopte la même conformation si les copolymères à base de PEG-PLA sont dispersés dans l'eau ou dans le  $\text{D}_2\text{O}$ .<sup>[27]</sup> Il serait donc possible d'utiliser la RMN pour explorer la conformation des nanoparticules à base de mPEG-PLA/espaceur-cabazitaxel.

La spectroscopie RMN a été largement utilisée pour l'étude de micelles et de nanoparticules à base de structures amphiphiles.<sup>[25;28-31]</sup> Némethy *et al.*<sup>[30]</sup> ont développé des études RMN sur le tensioactif Triton X-100 [ $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{9-10}\text{-OH}$ ] dans différents solvants. Dans le benzène ou le dioxane, les analyses RMN montrent que les molécules sont dissoutes de manière homogène sous forme d'unimères. De la même manière, la couronne et le cœur des micelles ont été tous les deux observés lorsque le tensioactif est dispersé dans le  $\text{D}_2\text{O}$ . Ces résultats suggèrent que les protons hydrophobes dans la structure micellaire sont mobiles et donc de type « liquide », et que ces micelles sont bien de nature dynamique.

Langer *et al.*<sup>[29]</sup> ont utilisé la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  pour étudier la structure des nanoparticules de mPEG-PLA. Contrairement à l'étude menée sur les tensioactifs, les auteurs ont montré que dans le  $\text{D}_2\text{O}$  à température ambiante, les signaux correspondants à la couronne de PEG sont bien observés, alors qu'aucun signal correspondant au cœur PLA n'est détecté. Ce phénomène a été confirmé par Stolnik *et al.*<sup>[28]</sup> dans une étude sur des nanoparticules à base de mPEG-PLA. En effet, les analyses RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules dans le  $\text{D}_2\text{O}$  indiquent que le bloc hydrophile (PEG) est orienté vers la phase extérieure (eau) pendant la précipitation et le durcissement des nanoparticules, alors que le bloc hydrophobe de PLA forme le cœur interne. Les auteurs ont également constaté que l'augmentation de la température ( $70^\circ\text{C}$ ) permet de détecter jusqu'à 80% des signaux des  $-\text{CH}_3$  du PLA, ce qui montre que les chaînes de PLA sont beaucoup plus mobiles à haute température. Plus tard,



avec le même groupe, Davis *et al.*<sup>[25]</sup> ont mené des études sur le même type de nanoparticules en utilisant la spectroscopie RMN à l'état solide et à l'état liquide en fonction de la température. La combinaison de ces deux techniques a permis de montrer que le caractère solide du cœur de PLA augmente avec la taille de la chaîne de PLA. Il a été démontré également qu'il existe une région à l'interface PEG-PLA avec des protons  $-CH_3$  du PLA plus mobile que le cœur solide proprement dit. Les chaînes de PEG sont quant à elles détectées quasiment de manière quantitative au niveau de la surface hydrophile. L'augmentation de la température rend le cœur hydrophobe solide de plus en plus mobile et de type « liquide ».

Tous ces résultats nous ont encouragés à utiliser cette technique pour vérifier l'orientation spatiale des polymères qui composent nos nanoparticules et également pour essayer de localiser le principe actif. Nous avons donc analysé par RMN  $^1H$  dans le  $D_2O$  les nanoparticules à base de conjugués linéaires et de structure Y pour vérifier la conformation « cœur-couronne » et comparer l'influence de la morphologie du conjugué sur le positionnement du PA au sein des nanoparticules.

Les spectres RMN  $^1H$  de deux types de nanoparticules (Y et linéaires) dans le  $D_2O$  à 20 °C montrent la présence uniquement des protons  $-CH_2-$  de la chaîne de PEG à 3.65 ppm (Figure 109). Les signaux des protons  $-CH_3$  (1.58 ppm) et  $-CH-$  (5.16 ppm) de la chaîne de PLA, ainsi que les protons de l'espaceur et du cabazitaxel, ne sont pas observés. Cette observation, valable pour tous les conjugués linéaires et de structure Y de taille 12 kDa, indique que les protons du PLA et du cabazitaxel sont dans un environnement solide et ne peuvent pas être détectés, alors que le PEG semble être dans un état mobile. Ces analyses RMN  $^1H$  des nanoparticules confirment leur structure « cœur-couronne », mais ne donnent pas d'information supplémentaire sur la localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules.

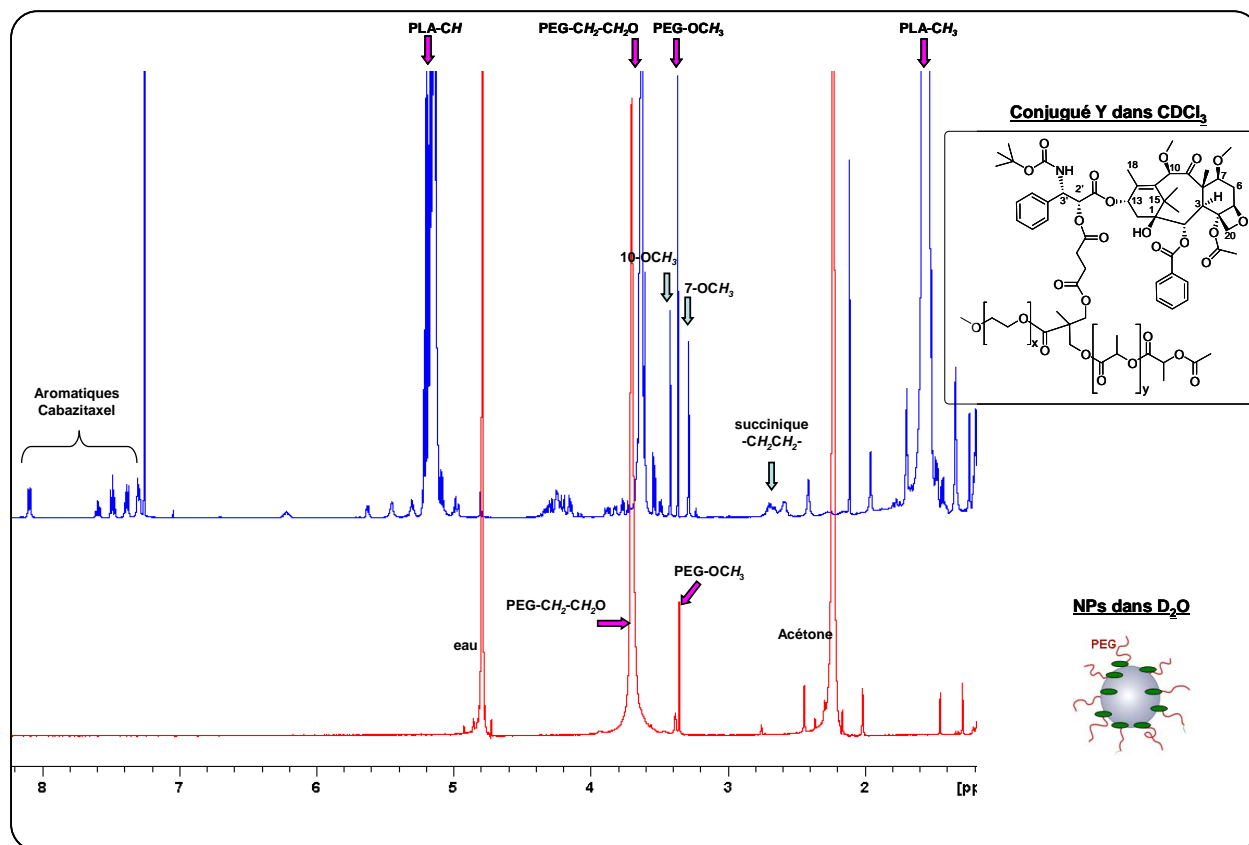
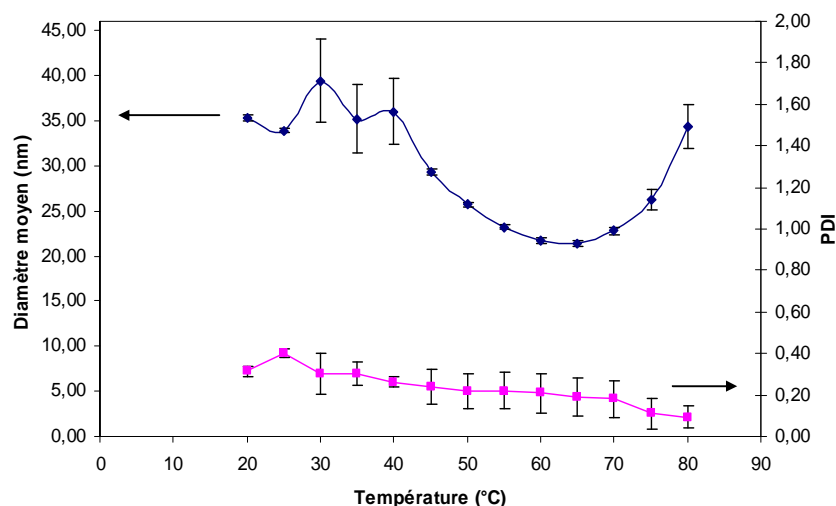


Figure 109 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  à 20 °C du conjugué mPEG-PLA-Y-succinyl-cabazitaxel (12 kDa) en solution dans  $\text{CDCl}_3$  et des NPs correspondantes formulées dans  $\text{D}_2\text{O}$ .

La détection des protons  $-\text{CH}_3$  du PLA à l'interface hydrophile/hydrophobe en augmentant la température, comme décrit précédemment, pourrait ainsi offrir une opportunité pour explorer la localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules. Le cabazitaxel serait en effet localisé préférentiellement à l'interface hydrophile/hydrophobe dans le cas des conjugués de structure Y. En revanche, dans le cas des conjugués linéaires, il serait encapsulé de manière homogène dans le cœur hydrophobe.

Mais avant de faire ces expériences RMN  $^1\text{H}$ , la résistance des nanoparticules au chauffage a été explorée à l'aide de la DLS. Sur la Figure 110 est tracé la variation du diamètre moyen et de l'indice de polydispersité (PDI) des nanoparticules (conjugué Y, 12 kDa) en fonction de la température. De manière globale, les nanoparticules restent stables et gardent un diamètre compris entre 20 nm et 40 nm tout en ayant un faible PDI (compris entre 0.10 et 0.30).



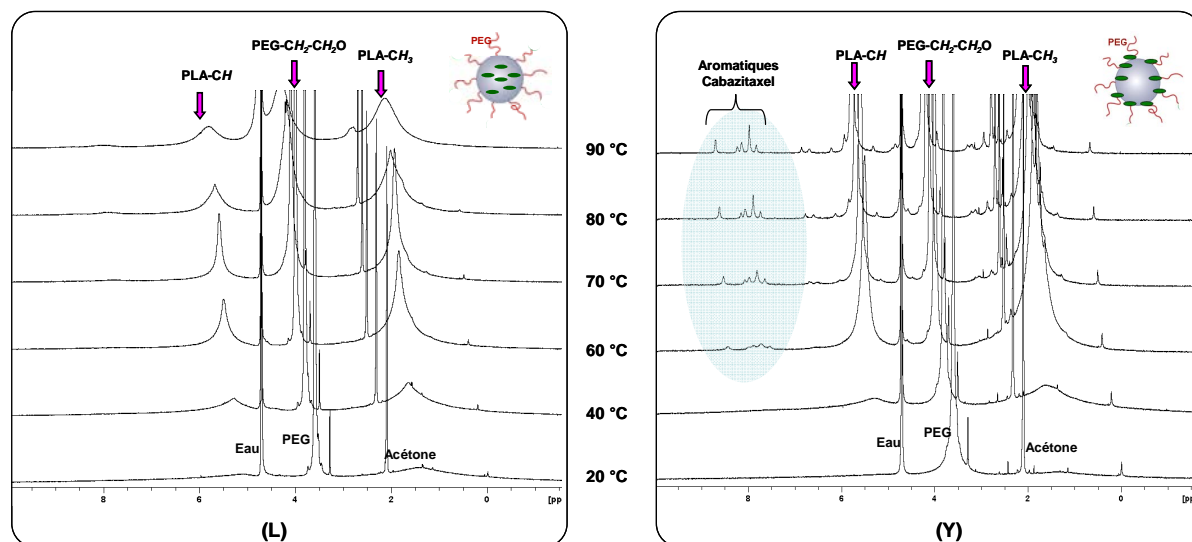
**Figure 110 : Variation du diamètre hydrodynamique moyen dans le D<sub>2</sub>O des nanoparticules de mPEG-PLA-Y-succinyl-cabazitaxel (12 kDa) en fonction de la température (de 20 °C à 80 °C) (n = 4).**

Par ailleurs, sur ce tracé, nous remarquons que le diamètre des nanoparticules est compris 35 nm et 40 nm pour des températures entre 20 °C et 40 °C. Mais à partir de 40 °C, ce diamètre commence par diminuer jusqu'à atteindre une valeur minimale d'environ 21 nm. Cette diminution du diamètre pourrait être expliquée par une déshydratation partielle de la couronne de PEG lorsque la dispersion est chauffée. Cette déshydratation résulte de la rupture partielle des liaisons hydrogène « éther-eau », ce qui diminue l'hydrophilie des chaînes de PEG.<sup>[32]</sup> Une telle déshydratation pourrait induire le repliement des chaînes de PEG et donc la diminution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules. D'un autre côté, la déshydratation partielle et le repliement des chaînes de PEG augmenteraient l'hydrophobie des nanoparticules. Ce phénomène pourrait ainsi induire l'agrégation des nanoparticules par interactions hydrophobes, ce qui expliquerait l'augmentation du diamètre à partir de 65 °C.

Dans tous les cas, cette étude montre bien qu'en chauffant la dispersion des nanoparticules dans le D<sub>2</sub>O (jusqu'à 80 °C) ces dernières restent stables, avec une gamme de taille satisfaisante et avec une faible polydispersité. Ces résultats nous ont incités à investiguer les différentes nanoparticules en RMN <sup>1</sup>H dans le D<sub>2</sub>O en variant la température, comme expliqué auparavant, sans crainte concernant leur stabilité.

La conformation des nanoparticules dans D<sub>2</sub>O a été donc explorée en RMN <sup>1</sup>H en faisant varier la température dans le but de rendre l'interface hydrophile/hydrophobe de plus en plus mobile. Ces études ont été effectuées à l'aide de la spectroscopie RMN <sup>1</sup>H à haut champ (500 MHz) avec des températures comprises entre 20 °C et 90 °C.

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules dans  $\text{D}_2\text{O}$  à différentes températures, formulées à partir de deux conjugués linéaire et de structure Y, sont présentés dans la Figure 111. A partir de 60 °C, les pics correspondants aux  $-\text{CH}_3$  (1.6 ppm) et aux  $-\text{CH}-$  du PLA (5.2 ppm) apparaissent de manière de plus en plus importante par rapport aux analyses effectuées à 20 °C. A partir de cette même température, il y a apparition de signaux correspondants aux protons aromatiques du cabazitaxel (8 ppm) dans le cas du conjugué de structure Y qui augmente avec la température. En revanche, dans le cas du conjugué linéaire, les signaux du cabazitaxel ne sont pas observés. Ce résultat montre que le cabazitaxel dans le cas du conjugué Y est localisé près de l'interface hydrophile/hydrophobe. En effet, l'augmentation de la température le rend, comme le PLA, de plus en plus mobile et donc visible en spectroscopie RMN, contrairement au conjugué linéaire. Le cabazitaxel dans ce dernier cas semble être encapsulé dans le cœur hydrophobe et solide de PLA.



**Figure 111 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) dans  $\text{D}_2\text{O}$  des nanoparticules à base de conjugués (mPEG-PLA/diglycolyl-cabazitaxel; 12 kDa) linéaire (L) et de structure Y (Y), à différentes températures.**

Ces résultats ont été confirmés pour deux espaceurs différents (diglycolique et succinique) couplés aux structures linéaire et Y, quasiment avec la même résolution et les mêmes proportions.

Maintenant que nous avons réussi à localiser le cabazitaxel au sein des nanoparticules (à l'interface hydrophile/hydrophobe pour les conjugués Y et dans le centre hydrophobe dans le cas des conjugués linéaires), nous allons étudier l'influence de cette distribution sur les profils de libération du principe actif.

## 2. Libération *in vitro* du cabazitaxel

La libération du paclitaxel *in vitro* est classiquement étudiée dans un tampon phosphate (PBS de l'anglais « *phosphate buffer solution* ») afin de mimer le milieu physiologique. Dans la majorité des études, la libération du paclitaxel se fait sur plusieurs jours voire quelques semaines.<sup>[1;18;33-36]</sup> Ces études ne tiennent pas compte des enzymes qui peuvent intervenir dans le mécanisme de libération du principe actif par hydrolyse de la liaison polymère-principe actif et/ou par dégradation de la matrice polymérique.

Les études de libération du principe actif à partir de nanoparticules polymériques se font généralement selon l'une de deux méthodes suivantes : (i) la méthode de dialyse<sup>[36]</sup> ou (ii) la méthode de centrifugation.<sup>[18;34]</sup>

La méthode de dialyse consiste à placer la nanodispersion dans une membrane de dialyse. La membrane est immergée dans le tampon (généralement PBS) à 37 °C et soumise à une agitation modérée. Ensuite, une partie ou la totalité du milieu est prélevée et remplacée par une solution fraîche de tampon. Enfin, le dosage du principe actif est effectué par HPLC à partir des différents prélèvements. Cette méthode semble ralentir la libération du principe actif à cause de la mise en jeu de la membrane de dialyse qui pourrait gêner la diffusion du principe actif.<sup>[37]</sup>

En ce qui concerne la méthode de centrifugation, la nanodispersion est diluée dans le milieu de libération (PBS ou plasma) et divisée dans plusieurs flacons. A chaque intervalle de temps, un flacon est centrifugé et le surnageant analysé par HPLC pour quantifier le principe actif libre. Cette méthode est généralement préférée dans le cas des nanoparticules. Mais, l'inconvénient de cette méthode est que le principe actif continue à être libéré durant l'étape de centrifugation, ce qui pourrait poser un problème de précision surtout dans le cas de petites nanoparticules de faible densité (elles nécessitent une longue période de centrifugation, pouvant aller jusqu'à plusieurs heures).

Comme nous l'avons expliqué dans le Chapitre I, le profil de libération des taxanes *in vitro* dépend essentiellement de la méthode d'encapsulation. Avec une encapsulation covalente, la vitesse de libération est considérablement réduite par rapport à une encapsulation physique gouvernée uniquement par les interactions hydrophobes entre le principe actif et les chaînes de PLA.<sup>[1;35]</sup> L'encapsulation covalente permet ainsi d'éviter une libération initiale trop rapide

(« burst release »). Cette libération dépend également de la distribution du principe actif au sein des nanoparticules.

Dans notre cas, une étude comparative des profils de libération du cabazitaxel a été menée sur les nanoparticules à base de conjugués linéaires et de structure Y. Le but de cette étude est de d'explorer l'influence de la structure sur le profil de libération. L'influence de la nature de l'espaceur sur le profil de libération a été également étudiée.

Les différentes études de libération ont été effectuées selon la méthode de centrifugation (cf. partie expérimentale). L'étape de centrifugation ne dure que 10 minutes, ce qui permet de ne pas surestimer la libération du principe actif. La quantification du cabazitaxel a été réalisée par UPLC (ou HPLC) avec une détection UV à 227 nm (ou 230 nm, respectivement). La libération a été explorée à 37 °C dans le plasma et dans deux tampons différents : PBS pH 7.4 et tampon acétate pH 5.5. Ces différents milieux sont importants pour comprendre le mécanisme de libération du principe actif (mécanisme chimique ou enzymatique). La libération du principe actif dans les tampons PBS et acétate met en jeu uniquement un mécanisme chimique, alors qu'une libération plus accentuée dans le plasma montrerait l'intervention des enzymes dans l'hydrolyse.

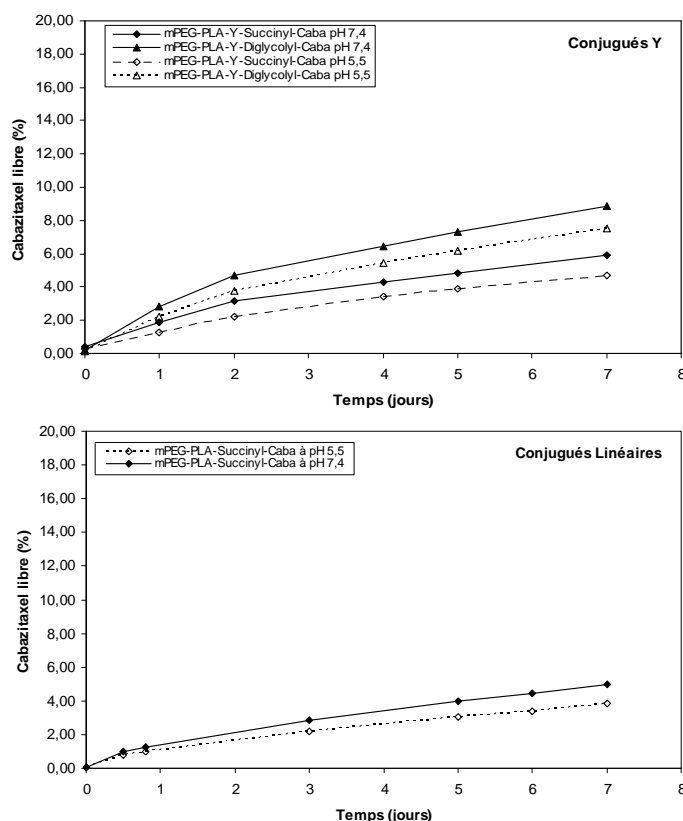
Dans ces différents milieux de libération, la stabilité des nanoparticules a été vérifiée. Ces dernières gardent quasiment la même distribution de taille et ne montrent pas de phénomène d'agrégation. Avant de commencer les études de libération, nous avons également vérifié la solubilité du cabazitaxel dans les différents tampons. A une concentration en conjugué de 1 mg/mL, la concentration du cabazitaxel dans le milieu pourrait atteindre 70 µg/mL (pour un taux de charge de 7%) dans le cas de 100% de libération. Cette concentration maximale reste bien inférieure à la solubilité du cabazitaxel qui est de l'ordre de 80 µg/mL.

#### *a. Libération in vitro dans les tampons de PBS et d'acétate*

Dans la littérature, les études de libération des taxanes se font généralement dans le PBS (pH 7.4) et non pas dans le plasma.<sup>[1;35]</sup> A titre d'exemple, pour un taux de charge en taxane d'environ 10% au sein des conjugués PEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>5000</sub>-diglycolyl-paclitaxel, seulement une libération d'environ 7% est atteinte au bout de 24 heures et environ 42% au bout d'une semaine.<sup>[1]</sup>

Ces études nous ont incités à explorer les profils de libération du cabazitaxel à partir des différentes nanoparticules dans le PBS (pH 7.4), mais également dans le tampon acétate (pH 5.5) pour mimer respectivement le milieu physiologique et le milieu intracellulaire qui est plus acide.

Les nanodispersions ont été incubées à 37 °C dans le tampon à une concentration de 1 mg/mL. La libération du cabazitaxel et de l'entité espaceur-cabazitaxel a été quantifiée par UPLC. Les résultats ont montré une libération négligeable d'espaceur-cabazitaxel. A titre d'exemple, dans le cas du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-succinyl-cabazitaxel, il y a moins de 0.5 % de succinyl-cabazitaxel libre présent initialement dans la formulation. Dans le cas des structure Y (12 kDa), les résultats montrent un profil de libération du cabazitaxel très lent avec les deux espaceurs (succinique et diglycolique) (Figure 112). Dans tous les cas, la quantité de cabazitaxel libre est de l'ordre de 5-8% après une semaine. Aucune différence significative n'a été observée entre le milieu à pH 7.4 et le milieu à pH 5.5. De la même manière, le conjugué linéaire mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>10000</sub>-succinyl-cabazitaxel montre une vitesse de libération très lente (5-6%) à pH 7.4 et pH 5.5. Il n'y a pas non plus une différence significative entre les deux structures Y et linéaire. Ces résultats prouvent que l'hydrolyse de la liaison « espaceur-cabazitaxel » est très lente quelque soit la position du cabazitaxel et la nature de l'espaceur. En effet, la présence de l'espaceur de type ester entre le cabazitaxel et le polymère permet de mieux contrôler la libération du cabazitaxel et de réduire le phénomène de « burst release ».<sup>[1;35]</sup>



**Figure 112 : Profils de libération du cabazitaxel dans les tampons PBS (pH 7,4) et acétate (pH 5,5) à une concentration de 1 mg/mL, à partir des conjugués de structure Y et linéaire formulés en nanoparticules.**

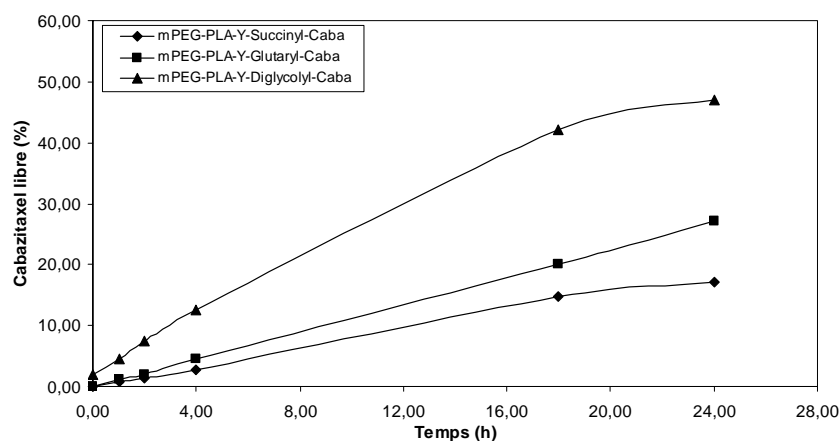
Contrairement à l'encapsulation covalente, les nanoparticules avec une encapsulation conventionnelle physique montrent généralement une libération rapide de l'ordre de 60-90% de leur charge en quelques minutes à une dizaine d'heures. Ce « burst » est attribué à une libération contrôlée uniquement par la diffusion du principe actif.<sup>[38]</sup> Cette libération initiale trop rapide observée en encapsulation physique peut être réduite dans certains cas en variant les paramètres de préparation et la composition de la formulation. Comme cela a été mentionné dans le Chapitre I, une récente étude de Langer *et al.* montre que le temps de libération de 50% (w/w) de docétaxel dans le PBS (pH 7.4) peut être amélioré en variant la composition de la partie hydrophobe : le temps de libération varie entre 6 h, 19 h et 45 h pour les compositions respectives PLA<sub>6500</sub>/mPEG<sub>5000</sub>-PLGA<sub>28000</sub> (1/1), PLA<sub>6500</sub>/ mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>16000</sub> (1/1) et mPEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>16000</sub>. Dans notre cas, la libération du PA dans le PBS reste malgré cela très lente par rapport à cette dernière étude (8% en 7 jours vs 50% en moins de 45 heures). Ces observations illustrent bien le rôle important joué par la liaison covalente dans la réduction du phénomène « burst ».



Par ailleurs, ces vitesses de libération sont aussi très faibles en comparaison avec l'étude menée avec le conjugué PEG<sub>5000</sub>-PLA<sub>5000</sub>-diglycolyl-paclitaxel (5-8% vs 42% au bout d'une semaine).<sup>[1]</sup> Cette différence peut être attribuée essentiellement aux tailles des chaînes de PLA et de PEG. Dans notre cas, la taille du PLA est deux fois plus grande (10 kDa vs 5 kDa), il en résulte donc un cœur plus hydrophobe et plus compact. Cette différence permettrait de retarder d'abord la diffusion du milieu aqueux dans le cœur hydrophobe, et donc le clivage du principe actif, ensuite la diffusion du principe actif dans le milieu. D'un autre côté, les auteurs de cette étude utilisent une chaîne de PEG hydrophile de 5 kDa (2 kDa dans notre cas), ce qui favoriserait encore plus la diffusion du milieu aqueux à l'intérieur des nanoparticules, et donc le clivage du principe actif.

#### *b. Libération in vitro dans le plasma*

Parallèlement à ces études, des expériences de libération du cabazitaxel *in vitro* dans le plasma ont été réalisées chez Sanofi à Vitry-sur-Seine pour explorer essentiellement l'influence des enzymes présents dans le plasma sur le profil d'hydrolyse du cabazitaxel. Les dispersions de nanoparticules ont été incubées à 37 °C dans le plasma de rat à une concentration de 1 mg/mL et le cabazitaxel libre a été quantifié par HPLC. Les résultats d'hydrolyse dans le cas des conjugués de structure Y de taille d'environ 12 kDa sont présentés dans la Figure 113.



**Figure 113 : Profils de libération du cabazitaxel dans le plasma (1 mg/mL), à partir des conjugués de structure Y formulés en nanoparticules et avec trois espaceurs différents.**

Comme le montre cette figure, les études de libération du cabazitaxel *in vitro* dans le plasma de rat révèlent que les trois formulations de conjugués de cabazitaxel montrent un profil de

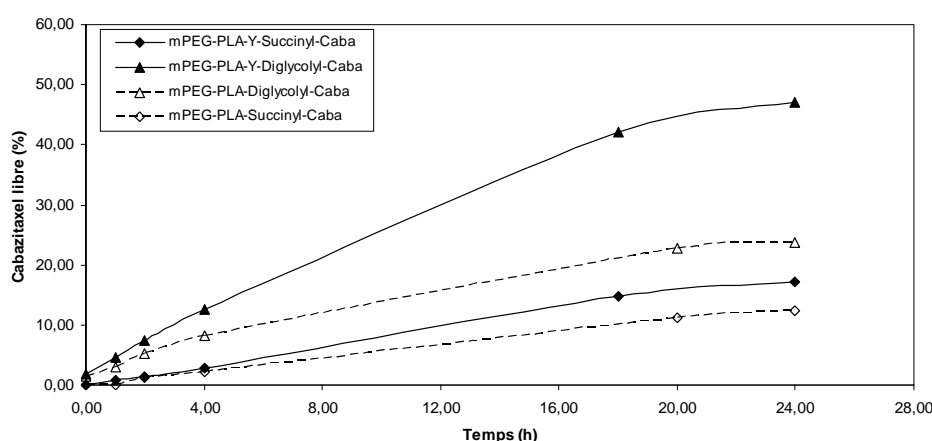
libération prolongé, évitant ainsi une libération initiale trop rapide (« burst release ») observée avec une encapsulation conventionnelle physique.<sup>[35]</sup>

Les conjugués (12 kDa) synthétisés à Vitry-sur-Seine, avec les espaceurs diglycolique, glutarique et succinique, montrent des profils de libération différents. Le conjugué contenant l'espaceur succinique montre le profil de libération le plus lent (~17% de cabazitaxel libre en 24 heures), suivi par le conjugué contenant l'espaceur glutarique (~27% de cabazitaxel libre en 24 heures), tandis qu'une libération relativement rapide est observée dans le cas du conjugué contenant l'espaceur diglycolique (~47% de cabazitaxel libre en 24 heures).

La libération de l'entité espaceur-cabazitaxel a été quantifiée par HPLC. Les résultats ont montré une libération négligeable d'espaceur-cabazitaxel. Globalement, l'ordre de libération était comme suit : mPEG-PLA-Y-diglycolyl-cabazitaxel > mPEG-PLA-Y-glutaryl-cabazitaxel > mPEG-PLA-Y-succinyl-cabazitaxel. Ces résultats indiquent que les conjugués de cabazitaxel formulés en nanoparticules permettent d'obtenir des profils de libération *in vitro* dans le plasma bien différents et dépendants de l'espaceur utilisé. L'augmentation de la vitesse d'hydrolyse peut être attribuée à l'augmentation de la séparation spatiale entre les deux liaisons esters, ce qui faciliterait l'approche des enzymes et le clivage du principe actif.<sup>[5;6]</sup> L'hypothèse de cette hydrolyse enzymatique est en effet confirmée en comparant les études réalisées dans les tampons à celles réalisées dans le plasma. Nous remarquons que la libération du cabazitaxel est beaucoup plus rapide dans le plasma avec les deux espaceurs diglycolique et succinique. A titre d'exemple, dans le cas du conjugué mPEG-PLA-Y-diglycolyl-cabazitaxel, une libération d'environ 47% de cabazitaxel est observée dans le plasma au bout de 24 heures, tandis que dans le PBS (pH 7.4) la libération ne dépasse pas 8% après une semaine. Ces résultats prouvent bien que le mécanisme d'hydrolyse de la liaison « espaceur-cabazitaxel » est principalement de nature enzymatique. Les différentes enzymes présentes dans le plasma permettent ainsi d'accélérer cette hydrolyse de manière significative.

Les profils de libération du cabazitaxel dans le plasma à partir des conjugués de structure Y ont été ensuite comparés à ceux des conjugués de structure linéaire. Le but de cette comparaison étant d'explorer l'influence de l'emplacement du principe actif, au sein du conjugué et au sein des nanoparticules, sur le profil de libération. Les études ont été réalisées en utilisant l'espaceur qui présente la libération la plus lente (*ie.* succinique) et l'espaceur qui présente la libération la plus rapide (*ie.* diglycolique).

Dans la Figure 114 sont tracés les profils de libération du cabazitaxel à partir des conjugués de structure linéaire (courbes discontinues) en comparaison avec la structure Y (courbes continus). Dans le cas du conjugué linéaire, la libération contrôlée sans « burst » est également vérifiée. Il est à noter aussi que la libération, dans le cas du conjugué linéaire, est deux fois plus rapide avec l'espaceur diglycolique qu'avec l'espaceur succinique (~24% vs ~12% de cabazitaxel libre en 24 heures). Ce résultat consolide la conclusion tirée des profils de libération du cabazitaxel à partir des conjugués de structure Y.



**Figure 114 : Profils de libération du cabazitaxel dans le plasma (1 mg/mL), à partir des conjugués, structure Y vs structure linéaire, formulés en nanoparticules et avec deux espaceurs différents.**

Pour un type d'espaceur donné, la libération du principe actif est plus rapide dans le cas de la structure Y par rapport au conjugué linéaire. Dans le cas de l'espaceur diglycolique, la structure Y présente une libération deux fois plus rapide (~47% vs ~24% de cabazitaxel libre en 24 heures). Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que dans le cas de la structure Y, comme le cabazitaxel est localisé à l'interface hydrophile/hydrophobe, il est donc plus accessible à l'hydrolyse. Tandis que dans le cas du conjugué linéaire, le cabazitaxel est piégé dans le cœur hydrophobe de PLA, qui est de nature « solide ». Son accessibilité est donc moins importante. Il en résulte ainsi une hydrolyse plus lente, en comparaison avec la structure Y.

Le profil de libération du cabazitaxel pourrait donc être contrôlé et modulé par le choix de la position du cabazitaxel au sein du conjugué (en extrémité de chaîne de PLA ou en position Y) et également par le choix de l'espaceur. Dans nos études, les espaceurs étudiés offrent des liaisons esters qui sont globalement plus facilement hydrolysables que certaines autres liaisons (ex. amide).

En conclusion, les nanoparticules formulées à partir des conjugués de structures Y et linéaires se différencient principalement par la distribution du cabazitaxel. Avec la structure Y, le cabazitaxel localisé à l'interface hydrophile/hydrophobe des nanoparticules est libéré avec une vitesse presque 2 fois plus rapide que dans le cas des conjugués linéaires. Dans ce dernier cas, le cabazitaxel est plutôt dispersé dans le centre des nanoparticules. Par ailleurs, cette différence est d'autant plus notable que les nanoparticules des conjugués Y sont moins stables que celles des conjugués linéaires, ce qui engendrait une libération plus rapide avec les conjugués Y. Cette différence de stabilité est déduite à partir des CMC qui sont plus faibles dans le cas des conjugués linéaires (0.75 mg/L vs 1 mg/L), les nanoparticules correspondantes sont donc plus stables pour des raisons thermodynamiques. Mais, il est à noter que la différence observée entre les valeurs de CMC n'est pas assez importante pour expliquer à elle seule une accélération remarquable (d'un facteur 2) de la libération du principe actif en passant d'un conjugué linéaire à un conjugué Y.

Actuellement, nous sommes également en train d'explorer la libération du cabazitaxel à partir des conjugués mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>5000</sub>-Y-diglycolique-cabazitaxel (avec une courte chaîne de PLA, 5000 g/mol). Cette libération va être comparée à celle des conjugués précédents (PLA, 10000 g/mol). La réduction de la taille de la chaîne de PLA (de 10 kDa à 5 kDa) permet d'une part d'augmenter le taux de charge en cabazitaxel [de 7% à 10% (w/w)], et d'autre part elle permettrait très probablement d'accélérer encore plus la libération du principe actif. L'influence de la taille de la chaîne de PEG (2000 vs 5000 g/mol), sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et sur le profil de libération est également en cours d'investigation.

Les profils de libération du cabazitaxel se caractérisent tous par leur caractère contrôlé et par l'absence d'un effet «burst» (libération initiale trop rapide). Ces résultats de libération *in vitro* ajoutés aux propriétés physico-chimiques satisfaisantes de nos nanoparticules (taille nanométrique de l'ordre de 30 nm, morphologie sphérique, stabilité satisfaisante et charge de surface négative) placent ces derniers comme bons candidats pour leur évaluation *in vivo* pour mieux appréhender leur apport thérapeutique.

#### **IV. Etudes in vivo**

Comme cela a été mentionné dans le Chapitre I, pour atteindre une activité thérapeutique satisfaisante, les nanoparticules encapsulant le principe actif doivent avoir un temps de circulation dans le sang prolongé [en évitant la capture par le système phagocytaire

mononucléaire (MPS)]. Cette prolongation du temps de circulation permettrait aux nanoparticules de s'accumuler préférentiellement au niveau du tissu tumoral grâce à l'effet EPR. De plus, la libération du principe actif doit être suffisamment lente pour éviter son élimination de l'organisme et son accumulation dans les tissus sains (synonyme de toxicité). Mais une fois au niveau de la tumeur, la libération doit être contrôlée et assez rapide pour atteindre une dose thérapeutique optimale.

Dans cette optique, la biodistribution des nanoparticules et du cabazitaxel a été explorée à l'aide d'études pharmacocinétiques chez la souris. Dans une première campagne, les études ont été réalisées sur des nanoparticules formulées à partir du conjugué mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>11000</sub>-Y-succinyl-cabazitaxel, par nanoprécipitation en présence de tensioactifs afin d'atteindre une concentration suffisante (jusqu'à 140 mg/mL). Les études *in vivo* de cette formulation ont été comparées à celle de la formulation commerciale (cabazitaxel + polysorbate 80 + éthanol).

Ces études permettent d'explorer d'une part la « furtivité » des nanoparticules qui se traduit par leur capacité à éviter leur élimination par le MPS (particulièrement le foie), et d'autre part leur capacité d'accumulation au niveau de la tumeur. Ses propriétés sont accessibles par dosage des macromolécules dans le sang, dans la tumeur et dans le foie.

La biodistribution dans l'organisme du cabazitaxel a également été étudiée. Sa concentration plasmatique au cours du temps ainsi que son accumulation dans le tissu tumoral par rapport au foie et aux tissus sains ont pu être estimés.

Des résultats préliminaires ont été obtenus grâce à ces études *in vivo*. Mais pour des raisons de confidentialité, les résultats de ces études ne peuvent pas être divulgués dans ce rapport de thèse.

## V. Conclusion

Comme dans le cas des conjugués linéaires PEG-PLA-Taxane, les conjugués de structure Y développés pour la première fois dans ce projet sont capables de s'auto-associer en nanoparticules encapsulant le principe actif dans le cœur hydrophobe de PLA. Dans les deux cas, le principe actif étudié (cabazitaxel) ne perturbe pas le caractère amphiphile des copolymères de PEG-PLA. Il permet d'améliorer la stabilité des nanoparticules, en comparaison avec les copolymères de PEG-PLA. Cette augmentation de la stabilité a été clairement vérifiée par les valeurs de CMC de différents copolymères et conjugués qui diminuent en présence de cabazitaxel. Le cabazitaxel, positionné en bout de chaîne de PLA ou entre la chaîne de PEG et la chaîne de PLA, participe ainsi à l'augmentation du caractère compacte du cœur des nanoparticules par interactions hydrophobes avec le PLA.

La formulation des conjugués a été réalisée à l'aide de la méthode de nanoprécipitation. Cette méthode, simple, reproductible et rapide, a permis d'obtenir des nanoparticules sphériques globalement de taille inférieure à 100 nm, de charge de surface négative et d'une stabilité satisfaisante. La charge de surface se rapproche de plus en plus de la neutralité en augmentant la proportion de PEG au sein du conjugué. Cette observation illustre clairement le rôle protecteur joué par le PEG à la surface des nanoparticules. Tous ces paramètres semblent être adéquats à l'utilisation de ces nanoparticules pour l'administration *in vivo* du cabazitaxel. Comme nous l'avons discuté dans le Chapitre I, les propriétés de ces nanoparticules permettraient ainsi d'éviter leur élimination rapide par phagocytose ou par filtration rénale et de favoriser leur accumulation au niveau du tissu tumoral.

Mais, avant d'évaluer ces nanoparticules *in vivo*, nous avons étudié les profils de libération du cabazitaxel à partir des nanoparticules de conjugués Y et linéaires. Les nanoparticules de conjugués Y montrent des molécules de cabazitaxel proches de l'interface hydrophile/hydrophobe, tandis que dans le cas des conjugués linéaires, le cabazitaxel est bien encapsulé dans le centre du cœur hydrophobe. Cette différence de localisation se traduit clairement par des vitesses de libération dans le plasma plus rapides avec les conjugués Y (jusqu'à deux fois plus rapide). Par ailleurs, la vitesse de libération du cabazitaxel, qui semble passer par une étape d'hydrolyse enzymatique de la liaison espaceur-cabazitaxel, dépend également de la nature de l'espaceur utilisé (diglycolique > glutarique > succinique). Cette dépendance a été vérifiée dans le cas des deux types de conjugués (linéaires et Y). Grâce à

cette étape d'hydrolyse, la libération du cabazitaxel semble être contrôlée et sans « burst effect » dans le cas des différents conjugués.

Enfin, les meilleurs candidats (en termes de taille, charge de surface, stabilité, taux de charge, profil de libération, etc.) doivent être évalués *in vivo* avec des études pharmacocinétiques afin de vérifier la furtivité des nanoparticules et leur capacité d'accumulation au niveau du tissu tumoral.





## Références

- [1] X. Xu, X. Zhang, X. Wang, Y. Li, X. Jing, *Polym. Adv. Technol.* **2009**, 20, 843-848.
- [2] Z. Xie, T. Lu, X. Chen, C. Lu, Y. Zheng, X. Jing, *J. Appl. Polym. Sci.* **2007**, 105.
- [3] E. Kang, J. Robinson, K. Park, J.-X. Cheng, *J. Controlled Release* **2007**, 122.
- [4] E. Kang, H. Wang, I. K. Kwon, J. Robinson, K. Park, J. X. Cheng, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 8036-8043.
- [5] A. Safavy, G. I. Georg, D. V. Velde, K. P. Raisch, K. Safavy, M. Carpenter, W. Wang, J. A. Bonner, M. B. Khazaeli, D. J. Buchsbaum, *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 1264-1274.
- [6] S. M. Ansell, S. Johnstone, P. Tardi, L. Mayer, Improved taxane delivery system, [WO/2009/070761], 4-6-**2009**.
- [7] C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* **2009**, 26.
- [8] P. Legrand, S. Lesieur, A. Bochot, R. Gref, W. Raatjes, G. Barratt, C. Vauthier, *Int. J. Pharm.* **2007**, 344, 33-43.
- [9] M. J. Rosen, J. T. Kunjappu, in *Surfactants and Interfacial Phenomena*, John Wiley & Sons, Inc., **2012**, 123-201.
- [10] M. Y. Kozlov, N. S. Melik-Nubarov, E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Macromolecules* **2000**, 33, 3305-3313.
- [11] C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, C. F. Nostrum, *J. Controlled Release* **2007**, 120, 131-148.
- [12] I. Astafieva, X. F. Zhong, A. Eisenberg, *Macromolecules* **1993**, 26, 7339-7352.
- [13] G. Riess, *Prog. Polym. Sci.* **2003**, 28, 1107-1170.
- [14] M. Wilhelm, C. L. Zhao, Y. Wang, R. Xu, M. A. Winnik, J. L. Mura, G. Riess, M. D. Croucher, *Macromolecules* **1991**, 24, 1033-1040.
- [15] K. Kalyanasundaram, J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 2039-2044.
- [16] M. Hans, K. Shimoni, D. Danino, S. J. Siegel, A. Lowman, *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2708-2717.
- [17] P. Jie, S. S. Venkatraman, F. Min, B. Y. C. Freddy, G. L. Huat, *J. Controlled Release* **2005**, 110.
- [18] S. S. Venkatraman, P. Jie, F. Min, B. Y. C. Freddy, G. Leong-Huat, *Int. J. Pharm.* **2005**, 298.
- [19] S. H. Kim, J. P. K. Tan, F. Nederberg, K. Fukushima, Y. Y. Yang, R. M. Waymouth, J. L. Hedrick, *Macromolecules* **2009**, 0.
- [20] R. S. Stock, W. H. Ray, in *Particle Size Distribution*, American Chemical Society, **1987**, p. pp. 105-114.
- [21] T. Riley, C. R. Heald, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, S. M. King, R. K. Heenan, S. C. Purkiss, R. J. Barlow, P. R. Gellert, C. Washington, *Langmuir* **2003**, 19.
- [22] S. Stolnik, M. C. Garnett, M. C. Davies, L. Illum, M. Boust, M. Vert, S. S. Davis, *Colloids Surf. , A* **1995**, 97, 235-245.
- [23] T. Riley, T. Govender, S. Stolnik, C. D. Xiong, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, *Colloids Surf. , B* **1999**, 16, 147-159.

- [24] R. Gref, M. Lück, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R. H. Müller, *Colloids Surf. , B* **2000**, *18*, 301-313.
- [25] C. R. Heald, S. Stolnik, K. S. Kujawinski, C. De Matteis, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, S. C. Purkiss, R. J. Barlow, P. R. Gellert, *Langmuir* **2002**, *18*, 3669-3675.
- [26] C. R. Heald, S. Stolnik, C. De Matteis, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, F. A. M. Leermakers, *Colloids Surf. , A* **2001**, *179*, 79-91.
- [27] *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, (Ed.: J. M. Harris) Plenum Press; New York, **1992**.
- [28] T. Riley, S. Stolnik, C. R. Heald, C. D. Xiong, M. C. Garnett, L. Illum, S. S. Davis, S. C. Purkiss, R. J. Barlow, P. R. Gellert, *Langmuir* **2001**, *17*.
- [29] J. S. Hrkach, M. T. Peracchia, A. Bomb, N. Lotan, R. Langer, *Biomaterials* **1997**, *18*, 27-30.
- [30] F. Podo, A. Ray, G. Nemethy, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6164-6171.
- [31] J. Godward, F. Heatley, C. Price, *J. Chem. Soc. , Faraday Trans.* **1993**, *89*, 3471-3475.
- [32] Q. Cui, F. Wu, E. Wang, *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 5913-5922.
- [33] Y. Dong, S.-S. Feng, *J. Biomed. Mater. Res. , Part A* **2006**, *78A*.
- [34] Y. Dong, S.-S. Feng, *Biomaterials* **2007**, *28*.
- [35] J. C. Rong Tong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*.
- [36] L. Yang, X. Wu, F. Liu, Y. Duan, S. Li, *Pharm. Res.* **2009**, *26*.
- [37] G. Gaucher, R. H. Marchessault, J. C. Leroux, *J. Controlled Release* **2010**, *143*, 2-12.
- [38] T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozzi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* **2006**, *325*, 172-179.

## ***Partie Expérimentale***



***Préparation des nanoparticules***

1) nanoprécipitation sans tensioactif : Les nanoparticules ont été préparées par la méthode de nanoprécipitation. 40 mg de conjugué PEG-PLA/cabazitaxel ont été dissout dans 2 ml d'acétone. La solution a été ensuite ajoutée goutte-à-goutte à 4 ml d'eau pour injection (WFI), sous forte agitation et à température ambiante. L'agitation a été laissée pendant 20 minutes. Enfin, l'acétone a été évaporée à 37 °C, en utilisant un évaporateur rotatif (Rotavap). La pression a été réduite graduellement de 350 mbar à 40 mbar (pendant 20 à 30 minutes), à l'aide d'un régulateur de vide. La concentration finale obtenue est de 10 mg/ml.

2) nanoprécipitation avec tensioactifs : 1g de mPEG-PLA-Y-succinyl cabazitaxel (VIII') a été dissout dans 50 mL d'acétone à température ambiante sous agitation. La phase organique a été filtrée à l'aide d'un filtre Nylon 0.45 µm, et ensuite introduite dans une seringue Hamilton de 50 mL. 0.2 g de Solutol HS15 (Macrogol 15 Hydroxystéarate) et 0.04 g de deoxycholate de sodium ont été dissout dans 450mL d'eau pour injection (WFI) sous agitation. La phase aqueuse a été filtrée à l'aide d'un filtre 0.22 µm. La phase organique a été versée, à une vitesse de 20 mL/h, dans la phase aqueuse, en utilisant une pompe à seringue. Afin d'obtenir une dispersion homogène, un tube en téflon connecté à la seringue, a été plongé dans la phase aqueuse. La taille moyenne des nanoparticules était de l'ordre de 30 nm, avec un PDI = 0.14.

L'acétone et une partie d'eau ont été éliminées par évaporation en utilisant un évaporateur rotatif, sous vide à 37 °C. La concentration finale des nanodispersions est comprise entre 10 et 200 mg/mL. La taille des nanoparticules reste inférieure à 100 nm (taille moyenne de 30 nm, pour toutes les concentrations). Les particules plus larges peuvent être retirées par filtration 0.45 µm.

***Concentration micellaire critique (CMC)***

La CMC des copolymères et conjugués dans l'eau déionisée (DI) a été déterminée par la méthode de fluorescence, en utilisant le pyrène comme sonde fluorescente. Les spectres de fluorescence (Intensité de la fluorescence  $I_\lambda$  en fonction de la longueur d'onde d'excitation) ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre de fluorescence Cary Eclipse VARIAN à 20 °C. Les échantillons ont été équilibrés pendant 10 minutes avant chaque mesure. Des fractions de pyrène dans une solution d'acétone ( $6.15 \times 10^{-5}$ , 20 µL) ont été ajoutées dans des flacons, en laissant l'acétone s'évaporer à l'air libre. Des solutions de copolymères et de conjugués (2 mL) à différentes concentrations (comprises entre  $10^{-2}$  mg/L et 10 mg/L) ont été

ensuite ajoutées aux flacons et laissées s'équilibrer pendant 24 heures. La concentration finale en pyrène dans chaque échantillon est de  $6.15 \times 10^{-7}$  M. Le spectre d'excitation a été enregistré entre 300 et 350 nm à une longueur d'onde d'émission de 400 nm. Le rapport d'intensités  $I_{337}/I_{334}$  à partir des spectres d'excitation a ensuite été analysé en fonction de la concentration des copolymères et des conjugués. La valeur de CMC a été déduite à partir de l'intersection entre la tangente de la courbe au niveau de l'inflexion (partie croissante de la courbe) et la tangente aux points enregistrés à faibles concentrations (partie correspondante à un plateau,  $I_{337}/I_{334} \sim \text{constant}$ ).

### ***Taille des nanoparticules***

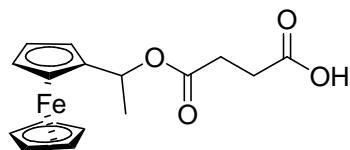
La distribution de tailles des nanoparticules a été étudiée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) à l'aide d'un appareil Malvern Instrument Zetasizer Nano ZS. La gamme des tailles pouvant être étudiée par cet appareil est comprise entre 0.3 nm et 10  $\mu\text{m}$ . L'appareil est muni d'un laser He-Ne qui émet une lumière monochromatique de longueur d'onde 633 nm. Le principe de cette technique consiste à mesurer les fluctuations de concentrations locales induites par le mouvement brownien des particules en solution. La lumière diffusée est analysée à  $173^\circ$  et les variations de l'intensité diffusée permettent de déterminer le coefficient de diffusion de particules, qui conduit au diamètre hydrodynamique des particules (supposées sphériques). La dispersion de nanoparticules est placée dans une cuvette de mesure en polystyrène à une concentration d'environ 0.2 mg/ml et analysée à  $20^\circ\text{C}$ , en mode exponentiel. Pour chaque échantillon, le diamètre moyen (Z-average) correspond à la moyenne de 3 mesures consécutives. L'échantillon est filtré préalablement avec un filtre PVDF 1.2  $\mu\text{m}$ .

### ***Potentiel Zêta***

Le potentiel zêta des nanoparticules est enregistré à l'aide d'un Zetasizer Nano ZS (Malvern). Environ 10  $\mu\text{L}$  de dispersion est dispersé dans 990  $\mu\text{L}$  de solution NaCl  $10^{-3}$  M. La solution a été ensuite disposée dans une cuvette capillaire de mesure du potentiel zêta (DTS1061, Malvern). Les mesures sont réalisées à  $20^\circ\text{C}$ . Pour chaque échantillon, le potentiel zêta correspond à la moyenne de 3 mesures consécutives.

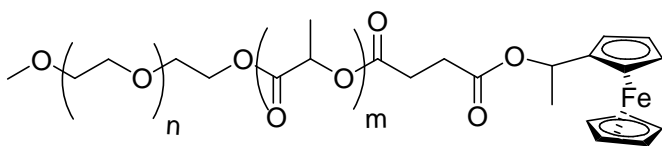
### ***Morphologie des nanoparticules***

La Microscopie Electronique à Transmission (MET ou TEM) à coloration négative a été utilisée pour déterminer la morphologie des nanoparticules préparées. Cette technique consiste à placer l'échantillon sous un faisceau d'électrons et de visualiser l'image fournie par la diffraction des électrons. Les différences de densité électronique qui existent au sein de l'échantillon conduisent à une absorption plus ou moins importante des électrons et créent ainsi un contraste au niveau de l'image. Lorsque les différences de densité électronique ne sont pas suffisantes pour la visualisation de l'image, il est nécessaire d'utiliser un agent de contraste tel que des sels de métaux lourds. Ces derniers absorbent les électrons et créent ainsi un contraste artificiel. Le microscope employé est de type JEOL-JEM 2100F qui opère à une accélération de champ de 200 kV. Les échantillons sont préparés par dilution de 10 fois des dispersions nanoparticulaires (concentration de 0.5 ou 1 mg/ml), et incubation avec une solution d'acide phosphotungstique 0.1% (w/v) pendant 30 minutes. Cet agent de contraste permet d'opacifier les régions de l'espace correspondantes aux parties polaires. L'échantillon est ensuite déposé sur une grille de cuivre couverte d'un film de carbone et séché à température ambiante.

**Synthèse du Succinyl-Ferrocène**

Dans un schlenk de 10 ml, 0.1 g (0.44 mmol) de  $\alpha$ -hydroxyéthylferrocène et 0.45 g (4.4 mmol) d'anhydride succinique et 0.01 g (0.88 mmol) de DMAP sont mélangés dans 2 mL de dichlorométhane. La solution est chauffée à 30°C toute la nuit. La solution est concentrée sous pression réduite et le résidu est purifié par HPLC (colonne C18, éluant gradient eau/acétonitrile de 90/10 à 50/50). Les fractions sont collectées et après évaporation des solvants à Ta sous vide, 0.120 g de poudre jaunâtre est obtenu. R = 82%.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.56 (m, 3 H), 2.67 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2$  succinique), 4.36 (m, 9 H, Cp), 5.85 (large q,  $-\text{CHMe}$ ).

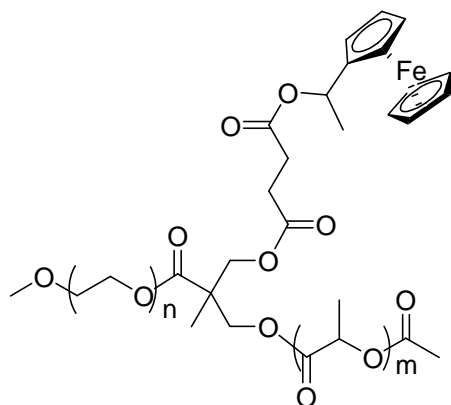
**Synthèse du conjugué linéaire mPEG-PLA-Succinyl-Ferrocène (12 kDa)**

Dans un schlenk de 10 ml sont ajoutés sous argon, 0.2 g de copolymère mPEG-PLA-OH (L1) (16.3  $\mu\text{mol}$ ), 12 mg (34.3  $\mu\text{mol}$ , 2.1 équ.) de succinyl-ferrocène dans 2 ml de DCM. Ensuite, 4.0 mg (2.0 équ.) de DMAP et 4.0 mg (1.95 équ.) de DIPC sont ajoutés. La suspension est agitée pendant 24 h à 35°C puis filtrée. La phase organique est concentrée et l'extrait est précipité dans 40 ml de méthanol à 0 °C. La suspension est filtrée et le solide est lavé avec 3 \* 10 ml de pentane, ensuite séché à Ta sous vide pour obtenir 150 mg du produit désiré. R ~ 75 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.40 à 1.80 (m, 425 H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.67 (m, 4H,  $-\text{CH}_2$  succinique), 3.37 (s, 3 H), 3.50 à 3.75 (m, 178 H), 4.18 à 4.50 (m, 11 H), 5.03 à 5.33 (m, 145 H).

SEC :  $M_n = 12\,300$  g/mol,  $M_w = 14\,150$  g/mol, IP = 1.15



**Synthèse du conjugué linéaire mPEG-PLA-Y-Succinyl-Ferrocène (12 kDa)**

Dans un schlenk de 10 ml sont ajoutés sous argon, 0.2 g de copolymère mPEG-PLA-Y-OH (VI') (16.3  $\mu\text{mol}$ ), 12 mg (34.3  $\mu\text{mol}$ , 2.1 éq.) de succinyl-ferrocène dans 2 ml de DCM. Ensuite, 4.0 mg (2.0 éq.) de DMAP et 4.0 mg (1.95 éq.) de DIPC sont ajoutés. La suspension est agitée pendant 24 h à 35°C puis filtrée. La phase organique est concentrée et l'extrait est précipité dans 40 ml de méthanol à 0 °C. La suspension est filtrée et le solide est lavé avec 3 \* 10 ml de pentane, ensuite séché à Ta sous vide pour obtenir 130 mg du produit désiré. R ~ 65 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1.19 (s, 3 H), 1.40 à 1.80 (m, 423 H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.12 (s, 3 H), 2.67 (m, 4 H,  $-\text{CH}_2$  succinique), 3.37 (s, 3 H), 3.50 à 3.75 (m, 180 H), 4.18 à 4.50 (m, 15 H), 5.03 à 5.33 (m, 142 H).

SEC :  $M_n$  = 12 150 g/mol,  $M_w$  = 14 215 g/mol, IP = 1.17

**STEM-EDX**

La microscopie électronique en transmission à balayage couplée à l'EDX (*Energy Dispersive X-ray*) (STEM-EDX) a été utilisée pour essayer de localiser le Fer au sein des nanoparticules préparées à partir des conjugués linéaire et Y de mPEG-PLA/Succinyl-Ferrocène (12 kDa). Les échantillons sont préparés par dilution de 10 fois des dispersions nanoparticulaires (concentration de l'ordre de 0.5 mg/ml). L'échantillon est ensuite déposé sur une grille de cuivre couverte d'un film de carbone et séché à température ambiante. Le microscope employé est de type JEOL-JEM 2100F qui opère à une accélération de champ de 200 kV. Les rayons X émis par les atomes sous l'effet des électrons sont détectés à l'aide d'un détecteur Quantax (Bruker) d'une surface de 30 mm<sup>2</sup> et d'une résolution de 127 eV.

***RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules dans D<sub>2</sub>O***

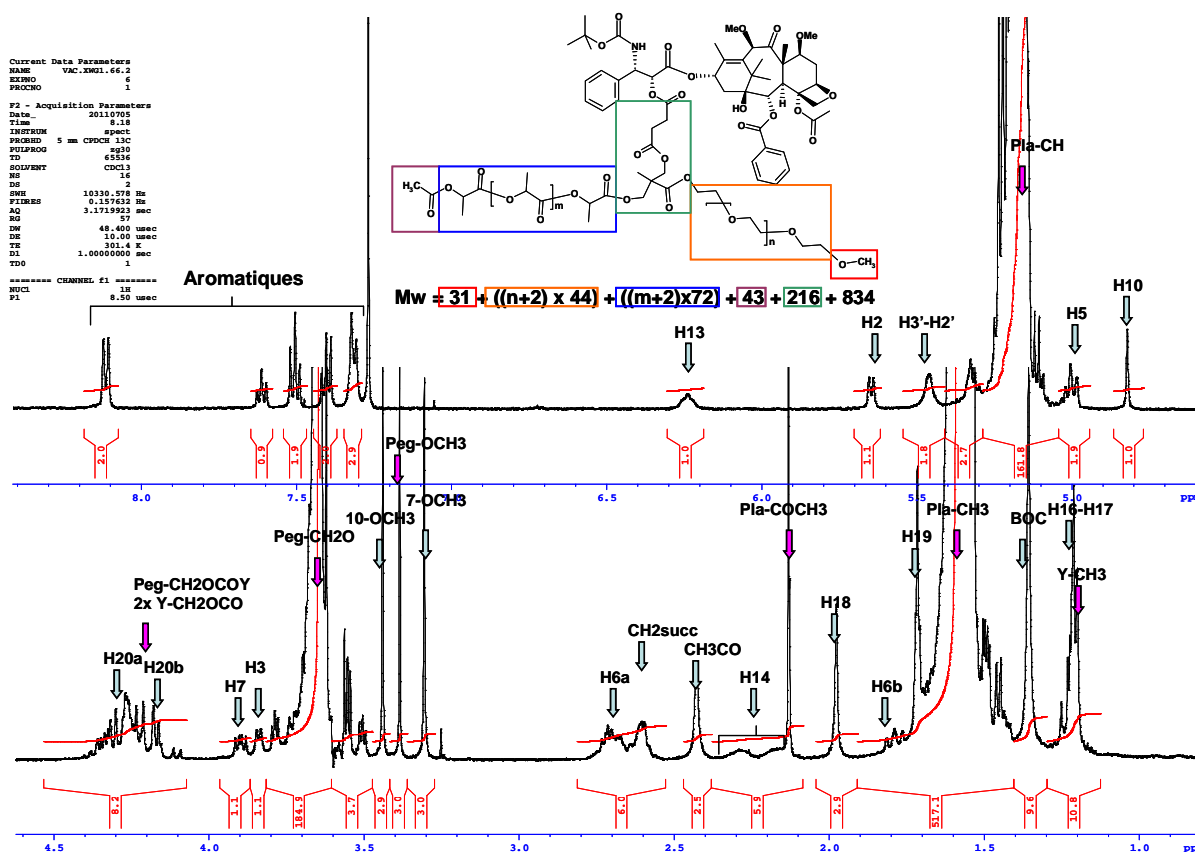
Les dispersions des nanoparticules à base de conjugués PEG-PLA/cabazitaxel de structures Y et linéaire ont été préparées selon la procédure décrite au-dessus, en remplaçant l'eau pour injection (WFI) par l'eau deutérée (D<sub>2</sub>O) et l'acétone par l'acétone deutérée. L'acétone a été évaporée sous un flux continu d'argon pour éviter l'exposition à la vapeur d'eau. Les spectres RMN <sup>1</sup>H des nanoparticules ont été enregistrés à différentes températures (20, 40, 60, 70, 80 et 90 °C) sur un Bruker Avance 500 MHz.

Nanoparticules du conjugué mPEG-PLA-Y-diglycolyl-cabazitaxel (12 kDa), RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz,  $\delta$  en ppm) : (i) **20 °C** : 3.4 [s, -OCH<sub>3</sub> (PEG)], 3.7 [m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- (PEG)]. (ii) **70 °C** : 2.0 [m, -CH<sub>3</sub> (PLA)] ; 3.7 [s, -OCH<sub>3</sub> (PEG)], 4.1 [m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- (PEG)]; 5.7 [m, -CH- (PLA)] ; 7.5-8.5 [m, aromatiques du cabazitaxel].

Nanoparticules du conjugué linéaire mPEG-PLA-diglycolyl-cabazitaxel (12 kDa), RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 500 MHz,  $\delta$  en ppm): (i) **20 °C** : 3.4 [s, -OCH<sub>3</sub> (PEG)], 3.7 [m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- (PEG)]. (ii) **70 °C** : 2.0 [m, -CH<sub>3</sub> (PLA)] ; 3.7 [s, -OCH<sub>3</sub> (PEG)], 4.1 [m, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O- (PEG)]; 5.7 [m, -CH- (PLA)].

### Mesure de la charge en Cabazitaxel

La charge en cabazitaxel a été déterminée par RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) à partir des conjugués PEG-PLA/Cabazitaxel. Elle a été calculée comme suit :  $M_{(\text{cabazitaxel})}/M_{\text{conjugué(RMN)}}$ .  $M_{(\text{cabazitaxel})} = 835 \text{ g/mol}$  et  $M_{\text{conjugué(RMN)}}$  est la masse molaire du conjugué déterminée par RMN  $^1\text{H}$ . Ci-dessous le calcul procédé pour déterminer la masse molaire du conjugué :



***Etudes de libération in vitro du Cabazitaxel à partir des formulations nanoparticulaires***

Dans les tampons PBS (pH 7.4) et acétate (pH 5.5) : Les cinétiques de libération du cabazitaxel à partir des différentes formulations de nanoparticules à base de conjugués de structures Y et linéaire ont été évaluées dans les tampons PBS et acétate (10 mM) en utilisant une technique UPLC. Des standards de cabazitaxel ou de formulations nanoparticulaires de conjugués PEG-PLA/cabazitaxel ont été ajoutés à des flacons contenant des fractions de tampon (1 mg/mL) pour obtenir un volume final de 1 mL. Les flacons ont ensuite été placés à 37 °C sur un agitateur (agitation modérée). Les analyses ont été effectuées pendant au moins une semaine à des intervalles réguliers de 24 heures.

À chaque intervalle de temps, les contenus ont été soumis à une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Un prélèvement de 100 µL du surnageant a été collecté et ajouté à un flacon contenant 100 µL d'acétonitrile puis soumis à une quantification en utilisant l'UPLC.

Les analyses en chromatographie UPLC ont été réalisées sur une chaîne UPLC équipée d'une pompe, d'un injecteur automatique et d'un détecteur UV PDA (Acquity UPLC, Waters). La colonne utilisée est une Colonne Acquity UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1x50 mm ; Débit 0.3 mL/min ; Température de colonne 35 °C ; Temps d'expérience 5 min ; Détection UV à 227 nm ; Phase mobile avec un gradient (tableau ci-dessous) : 0.1% Acide trifluoroacétique (TFA)/Eau et 0.1% TFA/CH<sub>3</sub>CN ; Temps de rétention du cabazitaxel = 0.97 min. Le logiciel de commande et de traitement des analyses est Empower (Waters).

Temps (min)	Débit (mL/min)	%A (0.1% TFA/Eau)	%B (0.1% TFA/CH <sub>3</sub> CN)
0	0.3	30	70
1	0.3	30	70
2	0.3	0	100
4	0.3	0	100
4.2	0.3	30	70

Dans le plasma : Les cinétiques de libération du cabazitaxel à partir des différentes formulations de nanoparticules à base de conjugués de structures Y et linéaire ont été évaluées dans le plasma (préalablement tamponné avec une solution PBS 500 mM pour obtenir une concentration finale de 10 mM dans le plasma) en utilisant une technique HPLC. Le plasma a été obtenu à partir de rats Sprague Dawley. Des standards de cabazitaxel ou de formulations nanoparticulaires de conjugués PEG-PLA/cabazitaxel ont été ajoutés à des flacons contenant des fractions de plasma (1 mg/mL) pour obtenir un volume final de 800 µL. Les flacons ont

ensuite été placés à 37 °C sur un agitateur (vitesse d'agitation 250 rpm). Les analyses ont été effectuées à 0h, 1h, 2h, 4h, 16h et 24h.

À chaque intervalle de temps, un prélèvement de 100 µL d'échantillon a été effectué dans un flacon contenant 0.3 mL d'acétonitrile:eau 85:15 v/v, et agité pendant 5 minutes pour permettre la précipitation des protéines et l'extraction du cabazitaxel libre. Les contenus ont ensuite été soumis à une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été collecté et soumis à une quantification en utilisant la HPLC.

Les conditions HPLC employées sont comme suit : Colonne : 150 mm Zorbax SB phényle 3.5 µm ; Flux : 1 mL/min ; Température de colonne : 30 °C ; Double détection UV à 230 nm (principalement utilisée pour le dosage) et 210 nm ; Phase mobile isocratique : Acétonitrile 60% / eau 40% /Acide trifluoroacétique 0.006% ; Temps de rétention du cabazitaxel = 4.1 min.



## ***Conclusion Générale et Perspectives***





Le concept de « *magic bullet* » imaginé il y a une centaine d'années par le savant Paul Ehrlich est devenu réalité. De nos jours, plusieurs systèmes nanométriques sont développés pour le transport et la vectorisation d'agents thérapeutiques ou d'agents de contraste vers un site d'action spécifique. La conception de ces outils a été possible grâce aux recherches menées ces dernières décades à l'interface de la physique, de la chimie et de la biologie.

Dans ce contexte une nouvelle collaboration est née entre l'équipe LBPB (Ligands Bifonctionnelles et Polymères Biodégradables, LHFA-Toulouse) et le département CMC (*Chemistry Manufacturing and Control*) de Sanofi à Vitry-sur-Seine dans le but de développer de nouveaux nanovecteurs à base de polymères bien définis, biodégradables et biocompatibles capables d'être utilisés pour leur administration *in vivo*.

Tout d'abord, dans le **Chapitre I**, une étude bibliographique a été détaillée dans le but de comprendre les principes de la vectorisation et de faire le point sur les principales avancées réalisées pour la vectorisation d'agents thérapeutiques par administration intraveineuse. Dans la littérature, plusieurs matériaux ont été utilisés pour la conception de nanovecteurs capables plus ou moins d'acheminer le médicament jusqu'au tissu tumoral. Parmi ces matériaux, les polymères biodégradables et biocompatibles offrent des opportunités intéressantes pour le développement de nanoparticules capables d'encapsuler des agents thérapeutiques, de les protéger de la dégradation, de circuler dans l'organisme sans induire de réaction immunitaire intense et de libérer les agents thérapeutiques au niveau de la tumeur. Les copolymères de PLA (polyester biodégradable) et de PEG (polyéther biocompatible) se sont avérés très prometteurs pour la conception par auto-assemblage de nanoparticules composées d'un cœur hydrophobe de PLA et d'une couronne hydrophile de PEG. Le PLA joue ainsi un rôle structural et permet d'encapsuler (physiquement ou chimiquement) des principes actifs très hydrophobes, tels que les taxanes. Le PEG, quant à lui, permet de stabiliser et de protéger ces nanoparticules de l'élimination rapide par le système immunitaire. Les nanoparticules de PEG-PLA acquièrent donc une circulation prolongée dans le sang leur permettant d'atteindre le tissu tumoral, s'y accumuler grâce à l'effet EPR et de libérer le principe actif. Toutes ces propriétés améliorent l'efficacité de l'agent thérapeutique et réduisent les effets secondaires qu'il pouvait engendrer. Par ailleurs, l'encapsulation covalente (ou chimique) du principe actif semble avoir plusieurs avantages par rapport à l'encapsulation physique. D'un côté, la conjugaison du principe actif au polymère permet de maîtriser et d'améliorer l'efficacité d'encapsulation et le taux de charge. D'un autre côté, elle permet d'obtenir une libération

contrôlée et prolongée du principe actif, évitant ainsi l'effet « burst » observé avec l'encapsulation physique. Les exemples d'encapsulation covalente décrits dans la littérature placent le principe actif en bout de chaîne de PLA. Il se retrouve ainsi dans le cœur hydrophobe des nanoparticules. Dans ce cas, la libération du principe actif dépend de plusieurs paramètres : (i) de l'accessibilité du principe actif à l'hydrolyse, (ii) de la dégradation de la matrice polymérique, (iii) des propriétés physico-chimiques du copolymère et (iv) de la diffusion du principe actif à l'extérieur des nanoparticules. Tous ces paramètres causent une libération assez lente du principe actif, ce qui pourrait limiter son efficacité thérapeutique *in vivo*. De plus, les conjugués décrits dans la littérature présentent de faibles degrés de caractérisation, ce qui rend difficile de quantifier précisément le greffage et de déterminer la nature et la pureté exacte du conjugué.

Il est ainsi important de développer de nouveaux conjugués fonctionnels avec un greffage covalent quantitatif du principe actif et qui permettent de préparer simplement par auto-assemblage des nanoparticules. Ces nanoparticules doivent présenter les critères requis pour la libération contrôlée du PA.

Notre stratégie a consisté à concevoir un copolymère amphiphile de PEG-PLA comportant un groupement fonctionnel à la jonction des deux blocs (PEG et PLA) pour permettre de lier chimiquement le principe actif (structure Y). Cette position a été choisie pour permettre de préparer des nanoparticules contenant les principes actifs à l'interface « cœur/couronne » (ou « hydrophobe/hydrophile ») dans le but de rendre le PA plus accessible à l'hydrolyse et ainsi accélérer la cinétique de libération. Dans le même temps, le positionnement du PA ne doit perturber ni la formation, ni la stabilité, ni l'efficacité de transport des nanoparticules. Pour mesurer l'effet de la structure macromoléculaire sur tous ces aspects, nous avons mené une étude comparative entre le conjugué linéaire « conventionnel » et le nouveau conjugué de structure Y.

La synthèse de conjugués de PEG-PLA/Taxane est détaillée dans le **Chapitre II**. Deux structures différentes (linéaire et Y), comportant des liens esters simples et hydrolysables, sont conçues pour être ensuite formulées en nanoparticules (Figure 115).

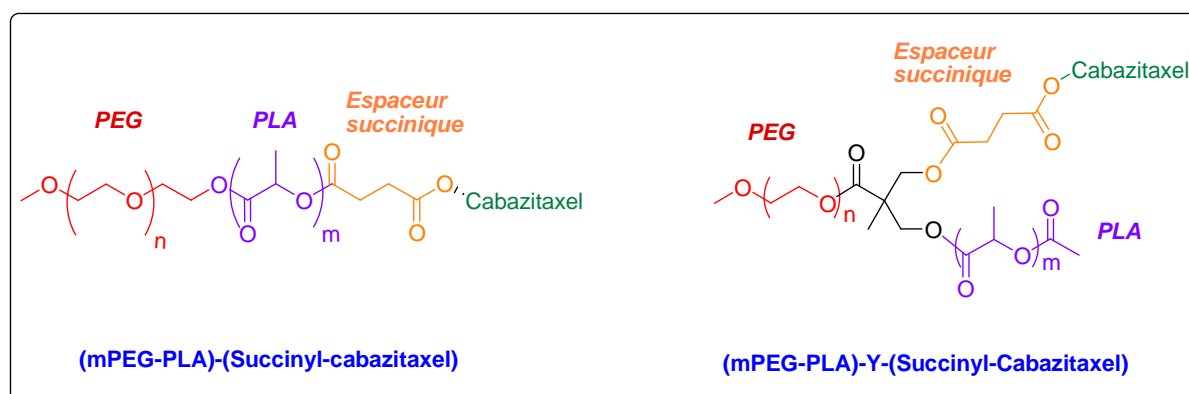


Figure 115 : Structures chimiques des conjugués linéaire et Y.

Le savoir-faire de l'équipe LBPB dans la synthèse de polymères biodégradables par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) et dans leur caractérisation est mis à profit pour la synthèse des copolymères mPEG-PLA fonctionnalisés. La variété de catalyseurs décrits dans la littérature nous a permis d'identifier le couple thiourée/spartéine qui est connu pour son efficacité et son bon contrôle de la ROP dans des conditions de manipulation douces. Il permet également de s'affranchir de la toxicité potentielle des catalyseurs métalliques, tel que l'octanoate d'étain qui est largement utilisé dans ce type de polymérisation. Tout au long de cette synthèse, une vigilance particulière a été accordée à la pureté des réactifs afin d'éviter les réactions secondaires, telle que la formation d'homopolymères de PLA en présence d'eau résiduelle. Sachant que tout produit macromoléculaire secondaire est difficilement séparé des produits désirés, contrairement à la synthèse organique à l'échelle moléculaire.

La synthèse du conjugué de structure Y nécessite le passage par un mPEG-diol monoprotégé pour amorcer la ROP. La stratégie de monoprotection du mPEG-diol à l'aide d'un dérivé silylé s'est avérée très efficace avec l' $i\text{Pr}_3\text{SiCl}$ . Ce dernier offre ainsi un bon encombrement stérique permettant de réaliser une protection sélective d'un seul groupement hydroxyle. Le macroamorceur, purifié et séché, est ensuite utilisé pour la ROP du *D,L*-lactide en présence du couple catalytique thiourée/spartéine. Après acétylation du groupement hydroxyle terminal du PLA, le  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  est sélectionné pour la déprotection sélective de l'éther silylé sans dégradation de la structure polymérique. L'élimination complète de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  est assurée par précipitation du copolymère dans l'éther et lavage au MeOH, et est vérifié ensuite par RMN  $^{19}\text{F}$ . Enfin, la conjugaison du principe actif aux deux structures (linéaire et Y) est effectuée par réaction d'estérification entre le copolymère possédant une fonction hydroxyle et l'entité cabazitaxel-espaceur carboxylique (succinique, diglycolique et glutarique). La réaction est suivie par RMN  $^1\text{H}$  jusqu'à 100% de couplage. Les produits finaux sont ensuite caractérisés à

l'aide de différentes techniques analytiques (SEC, RMN, DOSY, UPLC, analyse élémentaire) pour s'assurer de leur composition chimique, de la quantification précise du taux de greffage du PA et de leur pureté, en vue de leur formulation en nanoparticules et de leur évaluation *in vitro* et *in vivo*.

Dans le **Chapitre III**, nous avons exploré la capacité de différents conjugués à former des nanoparticules par simple auto-assemblage. L'influence du positionnement du PA sur la préparation et sur la stabilité des nanoparticules et la localisation du PA au sein des nanoparticules a été étudiée par comparaison avec les conjugués linéaires.

Les mesures de CMC par spectroscopie de fluorescence du pyrène montrent que l'incorporation covalente du cabazitaxel permet d'améliorer les propriétés d'auto-assemblage des copolymères amphiphiles PEG-PLA (diminution de la CMC de 4,7 mg/L à 0,75-1 mg/L, en passant des copolymères aux conjugués). Cette amélioration est expliquée par le caractère très hydrophobe du cabazitaxel qui participe avec le PLA à la formation d'un cœur hydrophobe et compact. Cette capacité élevée d'auto-assemblage des copolymères et des conjugués amphiphiles à base de PEG-PLA nous a incités à utiliser la méthode de nanoprécipitation pour formuler les conjugués en nanoparticules. Le choix de cette méthode est clairement justifié par sa simplicité, sa rapidité ainsi que par sa reproductibilité. Les deux types de conjugués (linéaire et Y) permettent d'obtenir des nanoparticules (diamètre compris entre 20 et 100 nm) de morphologie sphérique et stables sur une longue période de temps satisfaisante (au moins pendant 50 jours à 4 °C). Ces nanoparticules offrent une charge de surface négative qui diminue avec la proportion de PEG (de -25 mV à 10 mV). Une telle charge négative pourrait ainsi participer à la stabilité des nanoparticules par répulsions électrostatiques qui viennent s'ajouter aux répulsions stériques assurées par les chaînes de PEG.

La localisation du cabazitaxel au sein des nanoparticules est ensuite réalisée grâce à la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  des nanoparticules dans le  $\text{D}_2\text{O}$ . Il s'est avéré que le cabazitaxel est situé proche de l'interface hydrophile/hydrophobe des nanoparticules dans le cas des conjugués Y. En revanche, dans le cas des conjugués linéaires, le cabazitaxel est plutôt piégé dans le centre du cœur hydrophobe de PLA. Ces distributions sont ensuite confortées par les études de libération du cabazitaxel *in vitro* dans le plasma. Ces études montrent ainsi une accélération (environ 2 fois plus rapide) de la libération du cabazitaxel en passant d'un conjugué linéaire à un conjugué Y. Dans le cas du conjugué Y, le chemin de diffusion des

enzymes d'hydrolyse ainsi que celui du cabazitaxel sont courts par rapport à la structure linéaire. En comparant les études de libération *in vitro* dans le plasma et dans les tampons, il est clair que le mécanisme de clivage du cabazitaxel est majoritairement enzymatique. Cette libération dépend également de la nature de l'espaceur reliant le principe actif au copolymère. La comparaison entre trois espaceurs différents a permis d'établir l'ordre de libération suivant : diglycolique > glutarique > succinique.

Après cette première preuve de concept sur les nanoparticules à base de conjugués Y, des études *in vivo* ont été menées par Sanofi avec le composé mPEG<sub>2000</sub>-PLA<sub>11000</sub>-Y-succinyl-cabazitaxel formulé en nanoparticules. Ces études ont été réalisées chez la souris par comparaison avec la formulation commerciale (cabazitaxel + polysorbate 80 + éthanol) dans le but de suivre la biodistribution des nanoparticules et du cabazitaxel, particulièrement dans le plasma, dans le tissu tumoral et dans le foie. Les profils de toxicité et d'efficacité *in vivo* ont été également déterminés. Mais, pour des raisons de confidentialité, les résultats de ces études ne peuvent pas être divulgués.

A notre connaissance, ce projet de thèse constitue un premier exemple de préparation de nanovecteurs à partir de conjugués présentant une architecture particulière, de type Y. L'influence de la structure du polymère sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules et sur les cinétiques de libération du PA a pu être vérifiée par comparaison avec les conjugués linéaires. La synthèse de ces nouvelles macromolécules de structure Y, leur formulation en nanoparticules ainsi que les cinétiques de libération du cabazitaxel en fonction de la nature de l'espaceur ont été brevetées. Les premiers résultats de ces travaux ouvrent la voie à plusieurs améliorations et perspectives.

En ce qui concerne la préparation des copolymères PEG-PLA-Y-OH, des améliorations peuvent être apportées à la stratégie de synthèse, particulièrement pour la synthèse du macroamorceur fonctionnalisé. En effet, il serait intéressant de simplifier la voie de synthèse, particulièrement en explorant une stratégie permettant d'éviter les étapes de protection/déprotection et l'utilisation d'un grand excès de  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ . La deuxième amélioration porterait sur la variation des organocatalyseurs pour la ROP du lactide afin d'identifier un catalyseur aussi efficace que le couple thiourée/spartéine, mais qui serait plus simple et facilement accessible. Il serait également intéressant d'explorer d'autres types de lien entre les blocs de PLA et de PEG qui serait plus robustes et plus modulables.

L'utilisation d'autres catalyseurs organiques est justifiée par la faible abondance de l'amine naturelle, la (-)-spartéine. La première alternative est donc d'utiliser la (+)-spartéine qui est synthétique, mais qui pose quelques problèmes d'approvisionnement. La seconde alternative consiste à remplacer la spartéine par une autre amine secondaire. Pour ce faire, nous avons commencé à tester quelques amines, telles que la triéthylamine (TEA) et la diméthylcyclohexylamine ( $\text{Me}_2\text{NCyHex}$ ), mais elles se sont avérées beaucoup moins actives que le couple thiourée/spartéine (Tableau 15). Comme cela a été mentionné dans le Chapitre II, nous avons également pu tester la DBU qui s'est avérée très active mais sans contrôle de la polymérisation.

Entrée	Catalyseur	Cat. (mol%)	DP	Conversion (%)	Temps de conversion (heures)	$M_w/M_n$	Remarques
1	DBU	1	100	98	< 0.25	1.30	ROP rapide, mais non contrôlée : Épaulements en SEC
2	Thiourée/Me <sub>2</sub> NCyHex	4/4	100	< 35	24	1.14	ROP très lente
3	Thiourée/TEA	4/4	100	< 10	48	--	ROP très lente
4	Thiourée/Spartéine	4/2	100	98	6	1.14	Système efficace

Polymérisation de *D,L*-Lactide (Concentration [LA]<sub>0</sub> : 1M dans DCM), à 35 °C. Amorceur : mPEG-OTBDPS-OH

Conversion : obtenu par spectroscopie RMN 1H.

DBU : amidine 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ène; Me<sub>2</sub>NCyHex : diméthylcyclohexylamine; TEA : triéthylamine

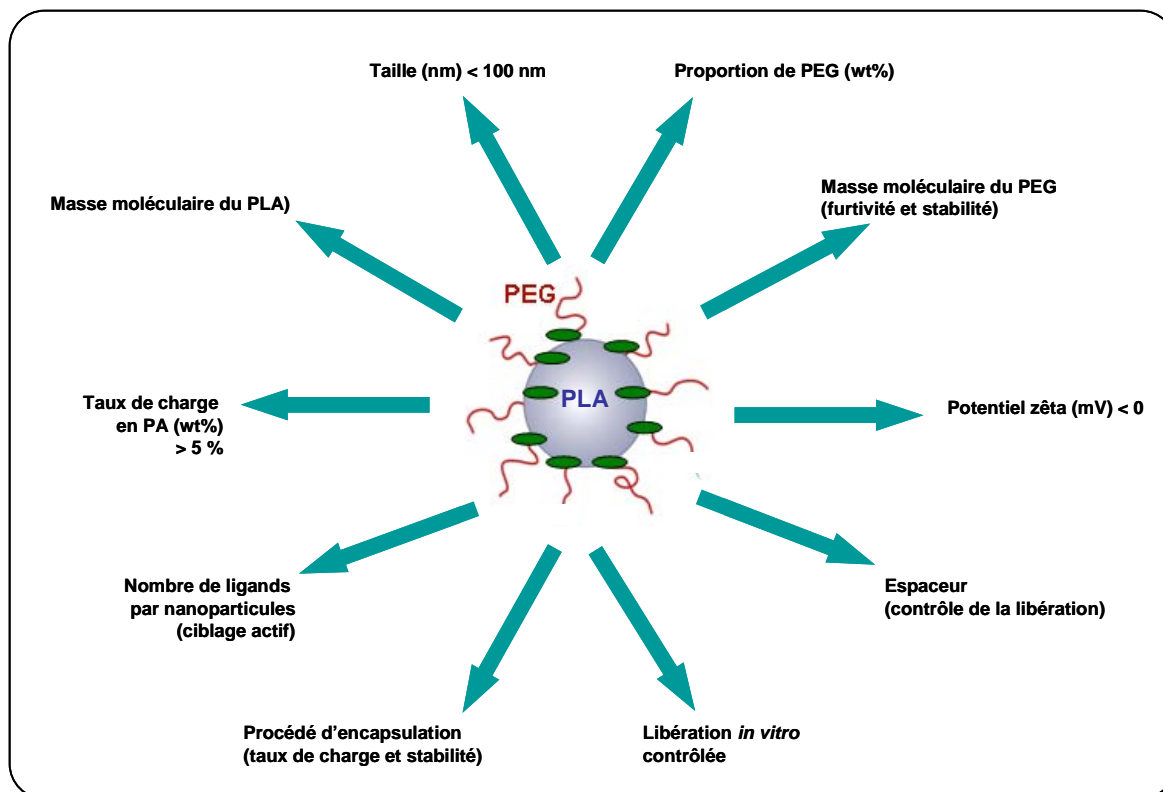
**Tableau 15 : Tests de polymérisation du *D,L*-lactide avec d'autres systèmes catalytiques en comparaison avec le couple thiourée/spartéine.**

Dans une récente étude d'Hedrick *et al.*, les auteurs ont montré que la tris[2-(diméthylamino)éthyl]amine (Me<sub>6</sub>TREN) pourrait remplacer efficacement la spartéine offrant une bonne activité et un bon contrôle pour la ROP du lactide avec une concentration en lactide 2.3 fois supérieure à celle utilisée dans le cas de la spartéine.<sup>[2]</sup> Un premier test a été réalisé avec cette amine et la thiourée (5/5 mol%) pour la ROP du lactide (1 M, DP 70) en présence du mPEG<sub>2000</sub>-OTIPS-Y-OH dans le CDCl<sub>3</sub> à 30 °C. Mais la polymérisation s'est avérée très lente par rapport à la spartéine (5% de conversion après 24h vs 98% après 4h). En revanche, la concentration du milieu réactionnel ([LA]<sub>0</sub> = 2 M) a permis d'accélérer significativement la ROP, avec une conversion de l'ordre de 95% en 8 heures ( $M_{n(SEC)} \sim 12500$  g/mol,  $M_w/M_n \sim 1.15$ ). La Me<sub>6</sub>TREN semble donc être très intéressante pour remplacer la spartéine à condition de conduire la ROP dans un milieu très concentré (> 2 M).

D'autres perspectives peuvent être envisagées sur la conception des conjugués et les applications des nanovecteurs, telle que la fonctionnalisation des nanoparticules à l'aide de ligands spécifiques. La combinaison de toutes ces modulations permettrait de générer une librairie de nanoparticules présentant des tailles, des compositions en conjugué et en polymère fonctionnalisés, des modes d'encapsulation et des concentrations très variés. A tous ces paramètres, peuvent s'ajouter également la méthode et les conditions de préparation des nanoparticules (nanoprécipitation ou émulsification, avec ou sans tensioactifs...). Cette stratégie, que nous avons déjà commencée à étudier en faisant varier la taille des chaînes de

<sup>2</sup> D. J. Coady, A. C. Engler, H. W. Horn, K. M. Bajjuri, K. Fukushima, G. O. Jones, A. Nelson, J. E. Rice, J. L. Hedrick, *ACS Macro Lett.* **2011**, *1*, 19-22.

PEG et de PLA, permettrait d'identifier les nanoparticules possédant les caractéristiques physico-chimiques optimales et de les évaluer *in vitro* et *in vivo* (Figure 116).



**Figure 116 : Schéma représentant les modulations possibles sur le conjugué, sur la formulation et sur les propriétés physico-chimiques des nanoparticules afin de préparer des systèmes efficaces pour la délivrance de principe actif.**



---

## **Nouvelles Nanoparticules à base de Conjugués Polymériques Biodégradables pour des applications en Drug Delivery**

Thèse présentée et soutenue par **Fethi BENSAID**, le **20 Septembre 2012** à **Toulouse**

Directeur de thèse : **Didier BOURISSOU**

Discipline : Chimie Macromoléculaire et Supramoléculaire

---

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le LHFA à Toulouse et le département CMC (*Chemistry Manufacturing and Control*) de Sanofi à Vitry-sur-Seine, et a pour but de développer de nouveaux nanovecteurs à base de conjugués polymériques biodégradables et biocompatibles capables d'être utilisés pour la vectorisation de principe actif.

Dans le premier chapitre, une étude bibliographique a été détaillée afin de comprendre les principes de la vectorisation et de faire le point sur les principales avancées réalisées pour la vectorisation d'agents thérapeutiques par administration intraveineuse, en particulier à l'aide de polymères biodégradables et biocompatibles, tels que le PLA et le PEG.

Dans le second chapitre, tirant profit de la catalyse organique de la ROP, de nouveaux conjugués macromoléculaires à base de PEG-PLA/Taxane, avec une architecture particulière de type « Y » positionnant le PA entre les blocs de PLA et de PEG, ont été synthétisés. Des conjugués de type PEG-PLA-Taxane linéaires ont aussi été préparés pour comparer l'influence de l'architecture sur les propriétés des nanovecteurs. La composition chimique de ces nanoconjugués a été précisément caractérisée à l'aide de plusieurs techniques analytiques (RMN, DOSY, UPLC, SEC...).

Dans le troisième chapitre, les conjugués macromoléculaires ont été formulés dans un milieu aqueux pour donner naissance à des nanoparticules de conformation « cœur-couronne ». Les deux différentes architectures permettent d'obtenir des NPs stables. Ensuite, L'utilisation de la spectroscopie RMN dans le D<sub>2</sub>O a permis de localiser le PA au sein des NPs : à l'interface hydrophile/hydrophobe pour les conjugués « Y » et dans le centre hydrophobe pour les conjugués linéaires. Enfin, les études de libération du PA *in vitro* ont montré des profils prolongés et différents en fonction de l'architecture et de la nature de l'espaceur : la libération la plus rapide a été obtenue avec la structure « Y » et avec l'espaceur « diglycolique ».

---

**Mots-clés :** PLA, PEG, Polymérisation par ouverture de cycle (ROP), Catalyse organique, Conjugués polymériques, Encapsulation, Vectorisation, Nanoparticules.

---

